

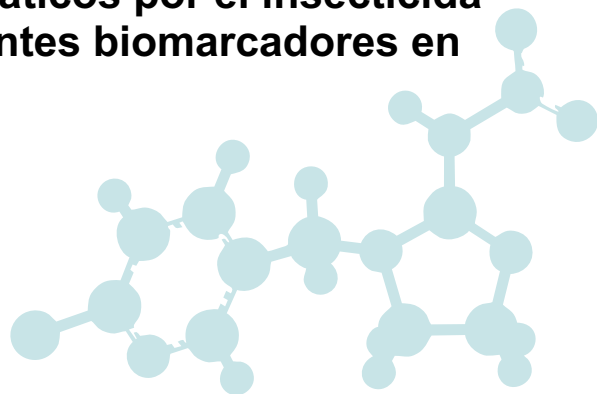


FACULTAD de CIENCIAS  
EXACTAS y NATURALES  
UNIVERSIDAD NACIONAL  
de MAR DEL PLATA

# **Contaminación de ecosistemas acuáticos por el insecticida Imidacloprid. Sensibilidad de diferentes biomarcadores en biomonitores animales y vegetales**

Lic. Fernando Gastón Iturburu

Directora: Dra. Mirta Luján Menone



**Tesis para optar por el Título de Doctor en Ciencias Biológicas**

Laboratorio de Ecotoxicología, Departamento de Ciencias Marinas, FCEyN, UNMdP

Mar del Plata, 2017



FACULTAD *de* CIENCIAS  
EXACTAS *y* NATURALES  
.....  
UNIVERSIDAD NACIONAL  
*de* MAR DEL PLATA

# **Contaminación de ecosistemas acuáticos por el insecticida imidacloprid. Sensibilidad de diferentes biomarcadores en biomonitores animales y vegetales**

Tesis para optar por el título de  
**DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Autor

**Lic. Fernando Gastón Iturburu**

Directora

**Dra. Mirta Luján Menone**

Laboratorio de Ecotoxicología  
Departamento de Ciencias Marinas  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Universidad Nacional de Mar del Plata  
Instituto de Investigaciones Marinas y  
Costeras (UNMdP-CONICET)

**Mar del Plata, 2017**



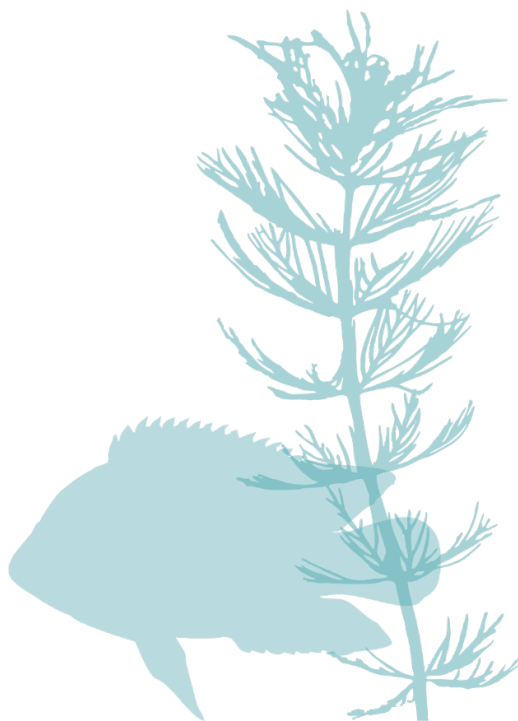


# Agradecimientos

- Al CONICET, a la ANPCyT, a la Universidad Nacional de Mar del Plata, al MINCyT y al Servicio Alemán de Intercambio Académico por los recursos provistos para desarrollar la presente tesis.
- Al Depto. de Ciencias Marinas de la FCEyN (UNMdP) por otorgarme el lugar de trabajo para la realización de esta tesis.
- A mi directora Dra. Mirta Menone, por su dedicación, confianza y estímulo en la realización de esta tesis.
- A la Dra. Andrea Crupkin, Dra. Julieta Mendieta, Dra. Fernanda Simoniello y la Lic. Ana Panzeri por su aporte en la realización de la presente tesis.
- A los jurados de esta tesis: Dra. Gisela Poletta, Dra. Fabiana Lo Nostro, Dr. Juan M. Díaz de Astarloa, por el tiempo y dedicación destinados a la corrección del manuscrito y sus aportes para mejorar el mismo.
- A mis padres, por permitirme e incentivarme a formarme en la Educación Pública.
- A Gabi, mi compañera de vida.
- A Germán y Dani por su amistad diaria.
- A amigos y colegas, que incentivaron mi interés en la ciencia e hicieron que el camino de esta tesis sea transitado con convicción.



# ÍNDICE



<b>Índice de abreviaturas .....</b>	<b>I</b>
<b>Índice de Figuras .....</b>	<b>III</b>
<b>Índice de Tablas .....</b>	<b>V</b>
<b>Resumen .....</b>	<b>VI</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>X</b>
<b>1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
1.1. Contaminación de ecosistemas acuáticos .....	2
1.2. Uso de plaguicidas .....	4
1.3. Neonicotinoides.....	8
1.4. Imidacloprid .....	12
1.5. Efecto de los neonicotinoides sobre la biota .....	18
1.6. Peces y macrófitas acuáticas como biomonitores.....	23
1.7. <i>Australoheros facetus</i> y <i>Myriophyllum quitense</i> como biomonitores .....	25
1.7.1. <i>Australoheros facetus</i> .....	25
1.7.2. <i>Myriophyllum quitense</i> .....	30
1.8. Biomarcadores .....	32
1.9. Estrés oxidativo .....	34
1.10. Biomarcadores de estrés oxidativo .....	35
1.11. Biomarcadores de daño al ADN.....	38
1.12. Hipótesis planteadas para la investigación .....	40
1.13. Objetivos planteados para la investigación .....	41
Bibliografía .....	42
<b>2. Materiales y Métodos .....</b>	<b>53</b>
2.1. Químicos .....	54
2.2. Obtención de especímenes de <i>A. facetus</i> y <i>M. quitense</i> .....	54
2.3. Ensayo para la determinación de inhibición de crecimiento en <i>M. quitense</i> ...	56
2.4. Ensayos para la cuantificación de biomarcadores en <i>M. quitense</i> .....	57
2.4.1. Ensayo concentración- respuesta.....	57
2.4.2. Ensayo tiempo- respuesta .....	58
2.5. Ensayo de incorporación de IMI en <i>A. facetus</i> .....	58
2.5.1. Condiciones de ensayo y obtención de muestras.....	58
2.5.2. Determinación y cuantificación de IMI en <i>A. facetus</i> .....	59
2.5.3. Factores de Bioconcentración .....	61
2.5.4. Análisis estadístico concentraciones de las concentraciones de IMI y los FBC .....	61

2.6. Ensayos para la cuantificación de biomarcadores en <i>A. facetus</i> .....	61
2.6.1. Ensayo concentración- respuesta.....	62
2.6.2. Ensayo tiempo- respuesta .....	63
2.7. Cuantificación de pigmentos en <i>M. quitense</i> expuesta a IMI .....	64
2.8. Enzimas de estrés oxidativo y contenido de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	65
2.8.1. Extractos enzimáticos .....	65
2.8.2. Actividades enzimáticas .....	66
2.8.3. Contenido de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	70
2.9. Biomarcadores de daño oxidativo .....	71
2.9.1. Productos de peroxidación lipídica (Malondialdehído, MDA).....	71
2.9.1.1. Peroxidación lipídica en <i>A. facetus</i> .....	71
2.9.1.2. Peroxidación lipídica en <i>M. quitense</i> .....	72
2.9.2. Oxidación de proteínas (grupos carbonilo).....	73
2.9.2.1. Cuantificación de grupos carbonilo en <i>A. facetus</i> .....	73
2.10. Determinación de la concentración de proteínas .....	74
2.11. Marcadores de Genotoxicidad .....	74
2.11.1. Micronúcleos y Anormalidades Nucleares en sangre de <i>A. facetus</i> .....	74
2.11.2. Ensayo cometa y oxidación de bases del ADN en <i>A. facetus</i> .....	76
2.11.2.1. Preparación de portaobjetos.....	77
2.11.2.2. Obtención de muestras y viabilidad .....	77
2.11.2.3. Montado de células y electroforesis.....	77
2.11.2.4. Observación de preparados y cálculo de índice de daño .....	78
2.12. Análisis Estadístico de Biomarcadores .....	79
Bibliografía .....	81

### **3. Capítulo 1: Crecimiento, concentración de clorofilas y estrés oxidativo en *Myriophyllum quitense* expuesta a imidacloprid.....84**

3.1. Resultados .....	85
3.1.1. Crecimiento.....	85
3.1.2. Pigmentos .....	86
3.1.2.1. Bioensayo a 14 días .....	86
3.1.2.2. Bioensayos Concentración- Respuesta durante 48 hs .....	87
3.1.2.3. Bioensayos Tiempo- respuesta a 100 µg/L IMI.....	88
3.1.3. Biomarcadores de Estrés oxidativo .....	89
3.1.3.1. Bioensayo Concentración- Respuesta durante 48 hs .....	89
3.1.3.2. Bioensayo Tiempo- Respuesta a 100 µg/L IMI .....	91

3.2. Discusión.....	93
Bibliografía .....	97
<b>4. Capítulo 2: Incorporación y distribución de imidacloprid en <i>Austroloheros facetus</i>.....</b>	<b>99</b>
4.1. Resultados .....	100
4.1.1. Concentración de IMI en el medio de exposición .....	100
4.1.2. Concentración de IMI en los tejidos de <i>A. facetus</i> .....	100
4.1.3. Factores de Bioconcentración .....	102
4.2. Discusión.....	103
Bibliografía .....	108
<b>5. Capítulo 3: Biomarcadores de estrés oxidativo en <i>Australoheros facetus</i> expuesto a imidacloprid .....</b>	<b>109</b>
5.1. Resultados .....	110
5.1.1. Bioensayo concentración- respuesta <i>A. facetus</i> . Estrés oxidativo.....	110
5.1.2. Bioensayo tiempo- respuesta <i>A. facetus</i> . Estrés oxidativo. ....	113
5.2. Discusión.....	117
Bibliografía .....	123
<b>6. Capítulo 4: Biomarcadores de daño genético en <i>Australoheros facetus</i> expuesto a imidacloprid. ....</b>	<b>125</b>
6.1. Resultados .....	126
6.1.1. Bioensayo Concentración- respuesta en <i>A. facetus</i> . Genotoxicidad. ....	126
6.1.2. Bioensayo Tiempo- respuesta <i>A. facetus</i> . Genotoxicidad.....	130
6.2. Discusión.....	132
Bibliografía .....	138
<b>7. Consideraciones finales .....</b>	<b>141</b>
<b>8. Contraste de hipótesis y conclusiones .....</b>	<b>144</b>
<b>8. Apéndice .....</b>	<b>148</b>

## Índice de abreviaturas.

**8- oxodGua:** 8-oxo-7,8-dihidro- 2'-desoxiguanosina.

**ADN:** ácido desoxirribonucleico.

**AMEG:** grupo de Ecotoxicología de Macrófitas Acuáticas (del inglés "Aquatic Macrophytes Ecotoxicology Group").

**AMRAP:** grupo de Evaluación del Riesgo por Plaguicidas en Macrófitas Acuáticas (por el inglés "Aquatic Macrophyte Risk Assessment for Pesticides").

**AN:** anormalidad nuclear.

**ANOVA:** análisis de varianza.

**APx:** ascorbato peroxidasa.

**BHT:** butil hidróxitolueno.

**BSA:** seroalbúmina bovina.

**C(-):** control negativo.

**CASRN:** número de registro en el "Chemical Abstracts Service".

**CAT:** catalasa.

**CDNB:** 1-Dicloro 2,4-dinitrobenceno.

**CICUAL:** Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio.

**DCC:** desorden de colapso de colmena.

**DDT:** dicloro difenil tricloroetano

**DMF:** N,N-dimetilformamida.

**DMSO:** dimetil sulfóxido.

**DNPH:** dinitrofenilhidrazina.

**DTE:** ditioeritritol.

**EC:** ensayo cometa.

**EDTA:** ácido etildiaminotetraacético.

**EFSA:** Autoridad de Seguridad Alimentaria Europea (del inglés "European Food Safety Authority").

**EMS:** etil- metanosulfonato.

**ERA:** Evaluación del Riesgo Ecológico (del inglés "Ecological Risk Assessment").

**ERO:** especie reactiva del oxígeno.

**EO:** estrés oxidativo.

**ESI:** ionización por electrospray.

**FBC:** factor de bioconcentración.

**GC:** grupo carbonilo

**GM:** genéticamente modificado

**GPx:** glutatión peroxidasa.

**GR:** glutatión reductasa.

**GSH:** glutatión reducido.

**GSSG:** glutatión disulfuro.

**GST:** glutatión- S- transferasa.

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** peróxido de hidrógeno.

**HCl:** ácido clorhídrico.

**IDEC:** índice de daño del ensayo "cometa"

**IMI:** imidacloprid

**IUPAC:** Unión Internacional de Química Pública y Aplicada (del inglés "International Union of Pure and Applied Chemistry").

**KCl:** cloruro de potasio.

**KDa:** Kilo- Dalton.

**Koc:** coeficiente de adsorción a carbono orgánico.

**Kow:** coeficiente de partición octanol- agua.

**LCA:** análisis del ciclo de vida (del inglés “life cycle assessment”).

**LOEC:** mínima concentración con la que se observa un efecto (del inglés “Lowest observed effect concentration”).

**LMP:** agarosa de bajo punto de fusión, (del inglés “low melting point”).

**MDA:** malonildialdehído.

**MMS:** metil- metanosulfonato.

**MN:** micronúcleo.

**nAChR:** receptores nicotínicos de acetilcolina.

**NaCl:** cloruro de sodio.

**NADPH:** Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.

**NaOH:** hidróxido de sodio.

**NMP:** punto de fusión normal (del inglés “normal melting point”).

**NOEC:** concentración sin efectos observados (del inglés “no observed effect concentration”).

**OECD:** Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (del inglés “Organization for Economic Co-operation and Development”).

**OPDS:** Organismo Provincial de Desarrollo Sustentable (Prov. Bs. As.).

**PBS:** solución tampón de fosfato (del inglés “phosphate buffered saline”).

**PMRA:** Agencia Regulatoria de Administración de Plaguicidas de Canadá (del inglés “Pest Management Regulatory Agency”).

**POD:** guaiacol peroxidasa.

**PPDB:** Base de Datos de Propiedades de los Plaguicidas (del inglés “Pesticides Properties Database”).

**PX:** peroxidasas.

**SCGE:** electroforesis en gel de una sola célula ( del inglés “Single Cell Gel Electrophoresis”).

**SDS:** sodio dodecil sulfato.

**SENASA:** Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria.

**SETAC:** Sociedad de Toxicología y Química Ambiental (del inglés “Society of Environmental Toxicology and Chemistry”).

**SOD:** superóxido dismutasa.

**TBA:** ácido tiobarbitúrico.

**TCA:** ácido tricloroacético



## Índice de Figuras.

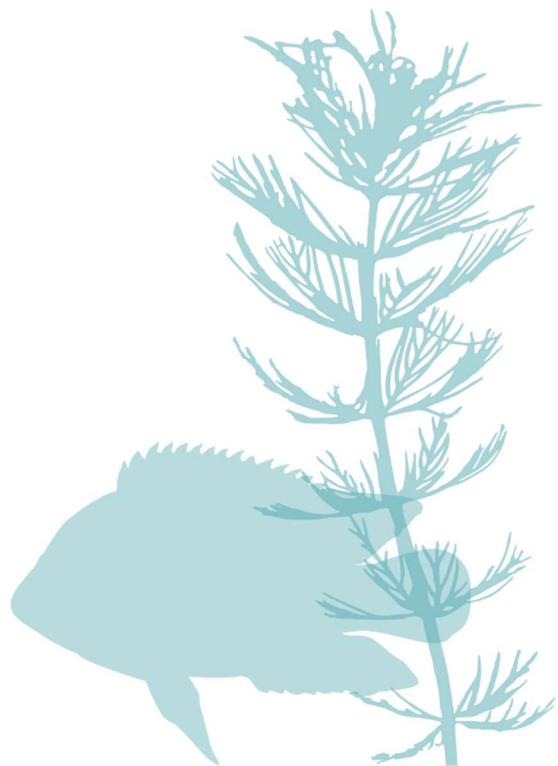
Figura 1: Distribución de un químico entre fases del ambiente .....	3
Figura 2: Producción de los principales cultivos extensivos (Maíz, Soja y Trigo) en Argentina .....	6
Figura 3: Mecanismo de acción de los insecticidas neonicotinoides .....	10
Figura 4: Nombre comunes y estructuras moleculares de los insecticidas neonicotinoides.....	11
Figura 5: Modelo hipotético específico del sitio de unión del insecticida imidacloprid .....	15
Figura 6: Interacciones entre plaguicidas, parásitos y patógenos estresores en relación al desorden de colapso de colmena .....	20
Figura 7: Especímen del cíclido <i>Australoheros facetus</i> .....	28
Figura 8: Especímenes de <i>Myriophyllum quitense</i> en el laboratorio.....	31
Figura 9: Ciclo redox.....	37
Figura 10: Esquema de los posibles procesos generadores de micronúcleos .....	38
Figura 11: Laguna pampásica típica donde habita <i>Australoheros facetus</i> .....	55
Figura 12: Estanque donde se colectaron los especímenes de <i>Myriophyllum quitense</i> ...	56
Figura 13: Microfotografías de eritrocitos de <i>Australoheros facetus</i> expuestos a imidacloprid .....	76
Figura 14: Microfotografía de eritrocitos de pez sometido al ensayo cometa .....	79
Figura 15: Curvas Concentración- Respuesta <i>Myriophyllum quitense</i> a 14 días. Clorofilas.....	87
Figura 16: Curvas Concentración- Respuesta <i>Myriophyllum quitense</i> a 48 hs. Clorofilas	88
Figura 17: Curvas Tiempo- Respuesta <i>Myriophyllum quitense</i> a 12, 24 y 48 hs. Clorofilas.....	89
Figura 18: Curvas Concentración- Respuesta <i>Myriophyllum quitense</i> . Estrés Oxidativo..	90
Figura 19. Curvas Tiempo- Respuesta <i>Myriophyllum quitense</i> . Estrés Oxidativo.....	92
Figura 20: Concentración de imidacloprid ( $\mu\text{g/g}$ peso seco) en encéfalo, sangre, branquias, músculo, hígado e intestino de peces expuestos a 100, 300 and 2500 $\mu\text{g/L}$ por 24 y 48 h.....	101
Figura 21: Curvas Concentración- Respuesta <i>Australoheros facetus</i> . Catalasa, glutatión-S- transferasas y glutatión reductasa.....	111
Figura 22: Curvas Concentración- Respuesta <i>Australoheros facetus</i> . Superóxido dismutasa y $\text{H}_2\text{O}_2$ .....	112
Figura 23: Curvas Concentración- Respuesta <i>Australoheros facetus</i> . MDA y grupos Carbonilo.....	113
Figura 24: Curvas Tiempo- Respuesta <i>Australoheros facetus</i> . Catalasa, glutatión-S- transferasas y glutatión reductasa.....	115

Figura 25: Curvas Tiempo- Respuesta <i>Australoheros facetus</i> . Superóxido dismutasa y $H_2O_2$ .....	116
Figura 26: Curvas Concentración- Respuesta <i>Australoheros facetus</i> . Micronúcleos y Anormalidades Nucleares.....	128
Figura 27: Microfotografía de un preparado de ensayo “Cometa” en sangre de <i>Australoheros facetus</i> .....	129
Figura 28. Regresiones lineales en biomarcadores de genotoxicidad en <i>Australoheros facetus</i> expuesto a imidacloprid.....	130
Figura 29: Curvas Tiempo- Respuesta <i>Australoheros facetus</i> . Micronúcleos y Anormalidades Nucleares.....	132

## Índice de Tablas.

Tabla 1: Cronología del desarrollo de plaguicidas.....	9
Tabla 2: Principales características físico-químicas del insecticida neonicotinoide imidacloprid .....	13
Tabla 3: Clasificación Taxonómica del cíclido sudamericano <i>Australoheros facetus</i> .....	27
Tabla 4: Clasificación taxonómica de la macrófita acuáticas <i>Myriophyllum quitense</i> .....	30
Tabla 5: Especies reactivas del oxígeno .....	34
Tabla 6: Curva Concentración- Respuesta <i>Myriophyllum quitense</i> a 14 días. Crecimiento.. .....	86
Tabla 7: Concentración nominal y cuantificada ( $\mu\text{g}/\text{L}$ ) de imidacloprid en agua .....	100
Tabla 8: Factores de Bioconcentración (FBC) en tejidos de <i>Australoheros facetus</i> expuesto a imidacloprid. ....	103
Tabla 9: Índice de daño del ensayo cometa y conteo sitios ENDO en <i>Australoheros facetus</i> expuesto a imidacloprid.....	130
Tabla 10: Biomarcadores de genotoxicidad y valores de toxicidad aguda de imidacloprid en anfibios y peces. ....	137

# Resumen



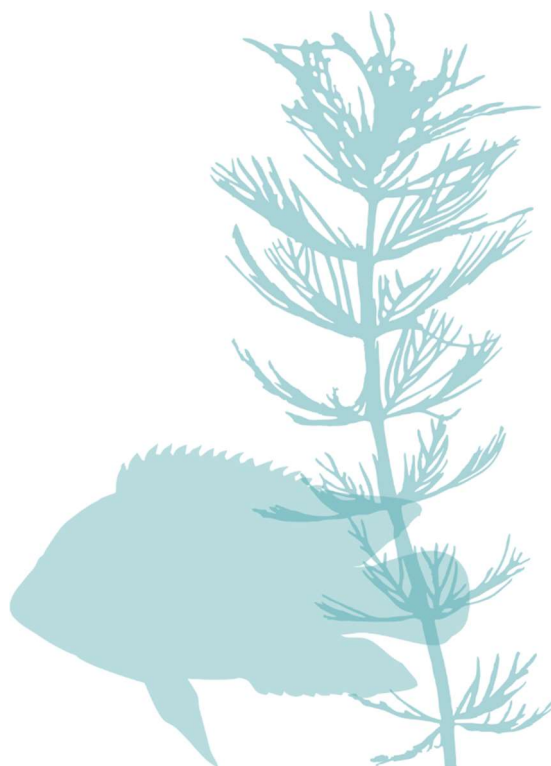
El aumento de las áreas naturales destinadas a la agricultura y el consecuente uso de plaguicidas aplicados sobre los cultivos genera preocupación y merece ser estudiado desde el punto de vista ecotoxicológico. El insecticida imidacloprid (IMI) fue el primer neonicotinoide incorporado masivamente en la agricultura, y hoy en día es uno de los compuestos más estudiados debido a su presencia en el ambiente y sus efectos en la biota silvestre. No obstante, sus efectos en organismos de ecosistemas acuáticos son escasamente conocidos. Los objetivos de la presente tesis fueron: 1) determinar los efectos de IMI en el crecimiento y las concentraciones de pigmentos fotosintéticos de la macrófita acuática *Myriophyllum quitense*; 2) analizar la distribución del IMI en los diferentes tejidos del pez dulceacuícola *Australoheros facetus*, 3) estudiar biomarcadores de estrés oxidativo: a) enzimáticos de exposición como la actividad de catalasa (CAT), glutatión reductasa (GR), glutatión-S-transferasa (GST), guaiacol peroxidasa (POD) y superóxido dismutasa (SOD) y las concentraciones de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y b) de daño como MDA y grupos carbonilo en *A. facetus* y en *M. quitense*, 4) cuantificar biomarcadores de daño genético como la frecuencia de micronúcleos (MN), la fragmentación del ADN y la oxidación de bases del ADN en *A. facetus* y 5) comparar la sensibilidad de estos biomarcadores de manera de seleccionar aquellos más sensibles en la especie más adecuada, a ser usada en futuros estudios de biomonitorio de zonas sujetas a contaminación por IMI. Se realizaron bioensayos utilizando concentraciones de relevancia ambiental del IMI, así como, en algunos casos, concentraciones mayores capaces de dilucidar mecanismos de distribución y toxicidad en los organismos. Los resultados del capítulo 1 mostraron que el IMI no afectó el crecimiento de la macrófita *M. quitense* luego de 14 días de exposición, si

bien afectó las concentraciones de pigmentos fotosintéticos a altas concentraciones en ese tiempo, y disminuyó la concentración de clorofilas totales en plantas expuestas entre 1- 100 µg/L IMI luego de 48 hs. Los bioensayos agudos realizados con el fin de testear el posible efecto de estrés oxidativo no mostraron cambios en la actividad de las enzimas antioxidantes evaluadas en la curva de concentración- respuesta; si bien se observó la disminución de las actividades de CAT y POD a 100 µg/L IMI en la curva tiempo- respuesta. Sin embargo, se detectó un incremento de las concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y MDA a 10 µg/L IMI luego de 48 hs de exposición, efecto que no se mantuvo a 100 µg/L IMI a juzgar por los datos de las curvas de concentración- y tiempo- respuesta donde no se observaron diferencias con el control negativo. En el capítulo 2 se observó la capacidad de incorporación del IMI en *A. facetus*. Los factores de bioconcentración (FBC) permitieron definir que este agroquímico, debido principalmente a su naturaleza hidrofílica, no se bioacumuló. Sin embargo, fue detectado en los tejidos del pez predominando en el intestino y el hígado. En el capítulo 3 se analizaron los biomarcadores de estrés y daño oxidativo en *A. facetus*, demostrándose que la actividad de las enzimas antioxidantes difiere en los organismos control dependiendo del tejido analizado. En los peces expuestos a 1, 10, 100 y 1000 µg/L IMI no se observaron diferencias en las actividades de CAT, GST y GR. Sin embargo, en el hígado se detectó una inhibición de la enzima SOD y un incremento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 100 y 1000 µg/L IMI. En el encéfalo y en la branquia se observó una condición hiperoxidativa caracterizada por la inhibición de SOD a 100 y 1000 µg/L IMI, acompañado por el incremento de los niveles de MDA. Los datos obtenidos en el capítulo 4 evidenciaron la genotoxicidad concentración- dependiente del IMI en *A. facetus*. Particularmente, la frecuencia de MN se



incrementó en peces expuestos a 1000 µg/L IMI luego de 48 hs de exposición, mientras que el análisis de la fragmentación del ADN mostró daño a 100 y 1000 µg/L IMI representando un incremento promedio de 50 y 70 % respectivamente, en comparación con el control negativo. Se observó además un incremento en la oxidación de las bases pirimidínicas del ADN entre 1- 1000 µg/L IMI. Los resultados de esta tesis demuestran la importancia de analizar la sensibilidad de los biomarcadores en la selección de los organismos biomonitores ante la exposición a IMI. Así, a partir de los datos plausibles de ser comparados entre ambas especies, *A. facetus* mostró respuestas de los biomarcadores de estrés oxidativo a partir de la concentración de 100 µg/L IMI, mientras que *M. quitense* lo hizo a partir de un orden de magnitud menor. Sin embargo, estas respuestas fueron menos robustas en *M. quitense*. A partir de los resultados obtenidos en los biomarcadores de estrés oxidativo, al comparar los datos de *M. quitense* y *A. facetus* se observó que los datos en *M. quitense* no fueron reproducibles entre las curvas de concentración- y tiempo- respuesta; mientras que en *A. facetus* las respuestas entre ambas curvas fueron consistentes. Finalmente, podemos concluir que IMI produjo efectos tóxicos subletales en las dos especies biomonitoras propuestas en concentraciones de relevancia ambiental (10-100 µg/ L IMI), alertando sobre la necesidad de, no sólo monitorear las concentraciones de IMI presentes en los cuerpos de agua superficiales, sino también de estudiar efectos tales como estrés oxidativo y genotoxicidad en las especies que allí habitan.

# Abstract

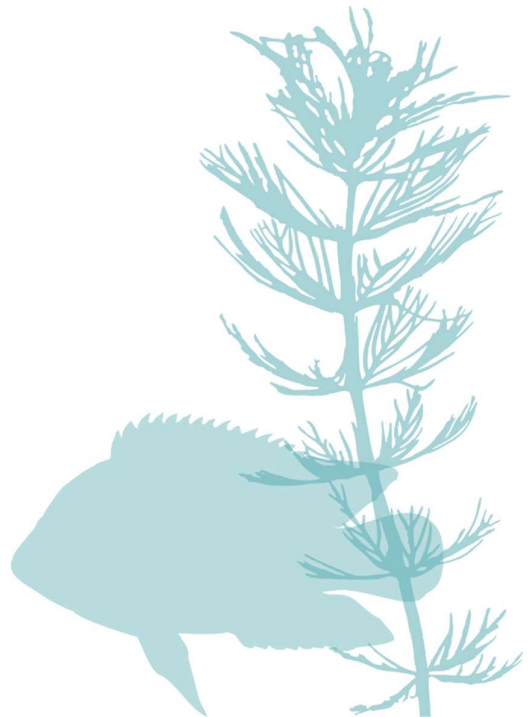


The increasing use of natural areas for agricultural activities and the associated use of pesticides is a current concern and it deserves to be studied from an ecotoxicological point of view. The insecticide imidacloprid (IMI) was the first neonicotinoid massively incorporated in the agriculture, and since its introduction it has been taking over the market. Currently, IMI is one of the most studied compounds due to its presence and effects in wildlife, although its effects in aquatic organisms are scarcely known. The objectives of this thesis were: 1) to determine effects of IMI in growth and photosynthetic pigment concentrations in the aquatic macrophyte *Myriophyllum quitense*; 2) to analyze the distribution of IMI in different tissues of the freshwater fish *Australoheros facetus*, 3) to study biomarkers of oxidative stress: a) of exposure: enzyme activities of catalase (CAT), glutathione reductase (GR), glutathione- S- transferase (GST), guaiacol peroxidase (POD) and superoxide dismutase (SOD) and the concentration of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and b) of damage: the concentration of malondialdehyde (MDA) and carbonyl groups in *A. facetus* and in *M. quitense*, 4) to quantify biomarkers of genetic damage like the micronucleus frequency (MN), DNA fragmentation and oxidation of DNA bases in *A. facetus*, and 5) to compare the sensitivity of these biomarkers in order to select those more sensitive in the best biomonitor to be used in future studies for biomonitoring purposes. Bioassays were carried out using environmentally relevant concentrations of IMI, as well as other higher ones in order to elucidate mechanisms of distribution and toxicity in the organisms. The results of chapter 1 showed that IMI did not affect the growth of *M. quitense* after 14 days of exposure, although it changed the concentrations of chlorophylls at high concentrations at that time, and it decreased the pigments in plants exposed to 1-100 µg/L IMI after 48 h. The

bioassays that were designed for testing the potential effect of oxidative stress showed no changes in the activities of the antioxidant enzymes in the concentration-response curves; although a decrease of CAT and POD activities at 100 µg/L IMI in the time- response curve was observed. At 10 µg/L IMI increased concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and MDA after 48 h were observed. These effects were not maintained at 100 µg/L IMI, judging by data from the concentration- and time- response curves where no differences from the control were observed. In chapter 2 the incorporation of IMI in *A. facetus* was studied. The bioconcentration factors (BCF) allowed to define that IMI, mainly due to its hydrophilicity, was not bioaccumulated. However, it was detected in different tissues and it predominated in gut and liver. In chapter 3, the study of biomarkers of oxidative stress and oxidative damage in *A. facetus* demonstrated that the basal activity of antioxidant enzymes differed among tissues. In fishes exposed to 1, 10, 100 and 1000 µg/L IMI no differences in the activities of CAT, GST and GR were observed. However, in liver an inhibition of SOD and an increment of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at 100 and 1000 µg/L IMI were observed. In brain and gills a hyperoxidative condition characterized by the inhibition of SOD at 100 and 1000 µg/L IMI was evident, in addition to an increment of MDA levels. Data from chapter 4 showed a concentration- dependent effect of genotoxicity of IMI in *A. facetus*. The frequency of MN increased in fishes exposed to 1000 µg/L IMI after 48 h, while DNA fragmentation occurred at 100 and 1000 µg/L IMI, representing an increment of 50 and 70 %, respectively. In addition, an increment of pyrimidinic DNA bases oxidation at 1- 1000 µg/L IMI was observed. The results of this thesis demonstrated the importance of analyzing the sensitivity of biomarkers in the selection of biomonitor organisms. Comparing data from both species, *A. facetus* showed responses of

oxidative stress from 100 µg/L IMI, while *M. quitense* at one order of magnitude lower than the fish. However, these responses were less robust because of the low reproducibility between the concentration- and time- response curves. Concluding, IMI exerted sublethal toxic effects in both biomonitors at environmentally relevant concentrations (10- 100 µg/ L IMI), alerting over the need of monitoring the concentrations of IMI in surface water bodies and of studying biomarkers of oxidative stress and genotoxicity in the selected species.

# 1. Introducción





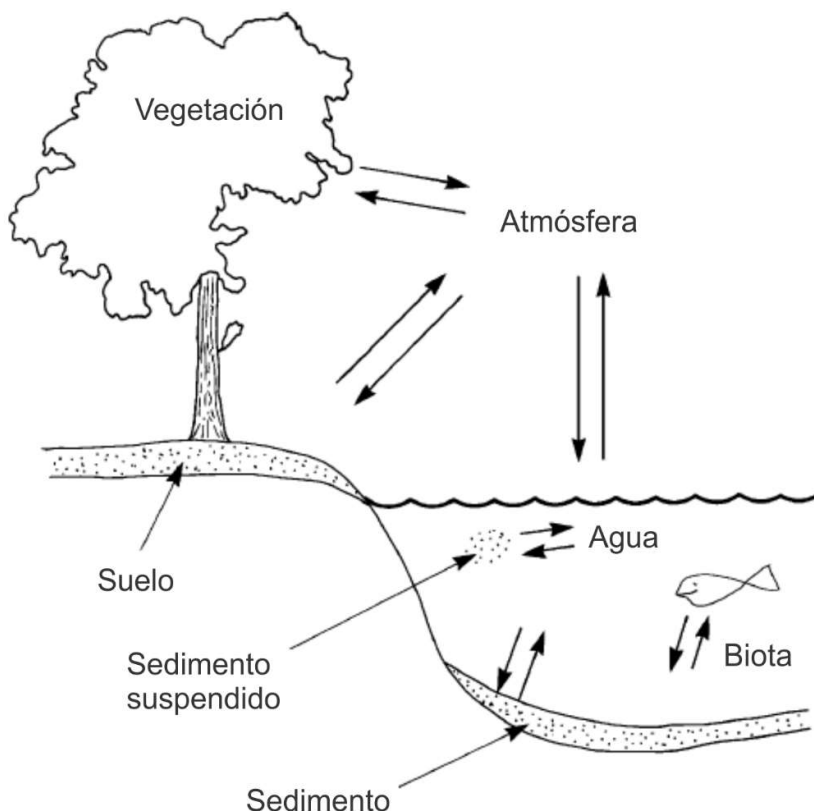
### **1.1. Contaminación de ecosistemas acuáticos.**

En el último siglo, las actividades humanas han afectado gravemente la condición de los ecosistemas dulceacuícolas en todo el mundo, mediante la alteración física, la pérdida de hábitat, la contaminación, la sobreexplotación y la introducción de especies exóticas que contribuyen a la disminución de las especies nativas (Revenga *et al.*, 2005). Es así como tanto diversos compuestos químicos, como otros estresores ambientales no químicos, han llevado a una crisis de biodiversidad global, con especial énfasis en los ecosistemas acuáticos dulceacuícolas (Liess *et al.*, 2016). Tanto es así que en la actualidad las especies que allí habitan están, en general, en mayor riesgo de extinción que las de los bosques, pastizales y ecosistemas costeros. Por ejemplo, en América del Norte, la tasa de extinción proyectada para la fauna de agua dulce es cinco veces mayor que la de la fauna terrestre, una tasa comparable a la pérdida de especies en la selva tropical. (Revenga *et al.*, 2005).

En la actualidad existen, sólo para la Unión Europea, más de 100.000 compuestos químicos registrados como productos manufacturados por el hombre, de los cuales entre 30.000 y 70.000 son usados diariamente. Una gran (pero desconocida) cantidad de estos compuestos pueden ser encontrados en el ambiente, principalmente en los ecosistemas acuáticos, junto a otros compuestos derivados de su transformación en el ambiente y subproductos de su manufacturación, formando mezclas complejas (Brack *et al.*, 2017).

Mediante una simplificación y a fines prácticos, se puede considerar que el ambiente natural consiste en la atmósfera, el agua (lagos, presas, arroyos, océanos, etc.), suelos, sedimentos, sedimentos suspendidos y biota. Cuando un producto químico es descargado al ambiente, se moverá y distribuirá entre las fases de acuerdo con las propiedades del producto químico y las propiedades de las fases (Connell, 2005).

En la figura 1 se observa un esquema de los posibles destinos de los contaminantes en el ambiente.



**Figura 1: Distribución de un químico entre fases del ambiente.** Se observan distintos procesos de partición involucrados entre dos fases, por ejemplo, atmósfera – agua, sedimento- agua, biota- agua. (Fuente: modificado de Connell, 2005).

Dentro de los contaminantes químicos, se encuentran compuestos tanto orgánicos como inorgánicos. Se pueden mencionar los metales pesados, hidrocarburos y compuestos halogenados, como así también un sinnúmero de compuestos químicos derivados de la minería, industria, efluentes cloacales o de la actividad agrícola-ganadera.

Las fuentes de contaminación por actividades agrícolas cobran importancia hoy en día debido a que nos encontramos ante un aumento de las áreas destinadas a la agricultura y el aumento del uso de plaguicidas aplicados sobre los cultivos (Jergentz

*et al.*, 2005; Ronco *et al.*, 2008), afectando las zonas costeras de los cuerpos de agua y los organismos que allí habitan (Lytle y Lytle, 2001).

Aunque el incumplimiento de las regulaciones podría estar contribuyendo a la afectación de la biota, la existencia generalizada de estos impactos sugiere que el enfoque actual de la evaluación del riesgo de plaguicidas no protege la biodiversidad cuando múltiples factores estresantes afectan simultáneamente a los organismos (Liess *et al.*, 2016). Por otro lado, los efectos de la contaminación acuática no solo se reflejan en los organismos de los cuerpos de agua, sino también pueden verse afectados componentes del medio terrestre, a través de relaciones tróficas o modificaciones de la biodiversidad de las zonas costeras (Schulz *et al.*, 2015).

## **1.2. Uso de plaguicidas.**

En el campo de la agricultura, el término “plaga” puede incluir insectos y ácaros que se alimentan de los cultivos, malezas en los campos, plantas acuáticas que obstruyen y dañan las zanjas de riego, o agentes que causan enfermedades de las plantas (hongos, bacterias, virus, nematodos, caracoles, babosas) y roedores que consumen las plántulas y granos. Así, un plaguicida es un aditivo intencional (generalmente químico) que el hombre utiliza para controlar estas plagas (Nollet y Rathore, 2009).

El 8 de marzo de 1968 William S. Gaud, administrador de la Agencia para el Desarrollo Internacional de Estados Unidos (USAID), acuñó el término “Revolución Verde”. Este término engloba el proceso de cambio en la producción agrícola mundial, basado en el uso de nuevas semillas, fertilizantes y plaguicidas para aumentar la producción de alimentos (AgBioWorld Foundation). Comenzaba entonces la era de la protección química de los cultivos, en principio, con compuestos organoclorados y fosforados (Nollet y Rathore, 2009). Así es como se

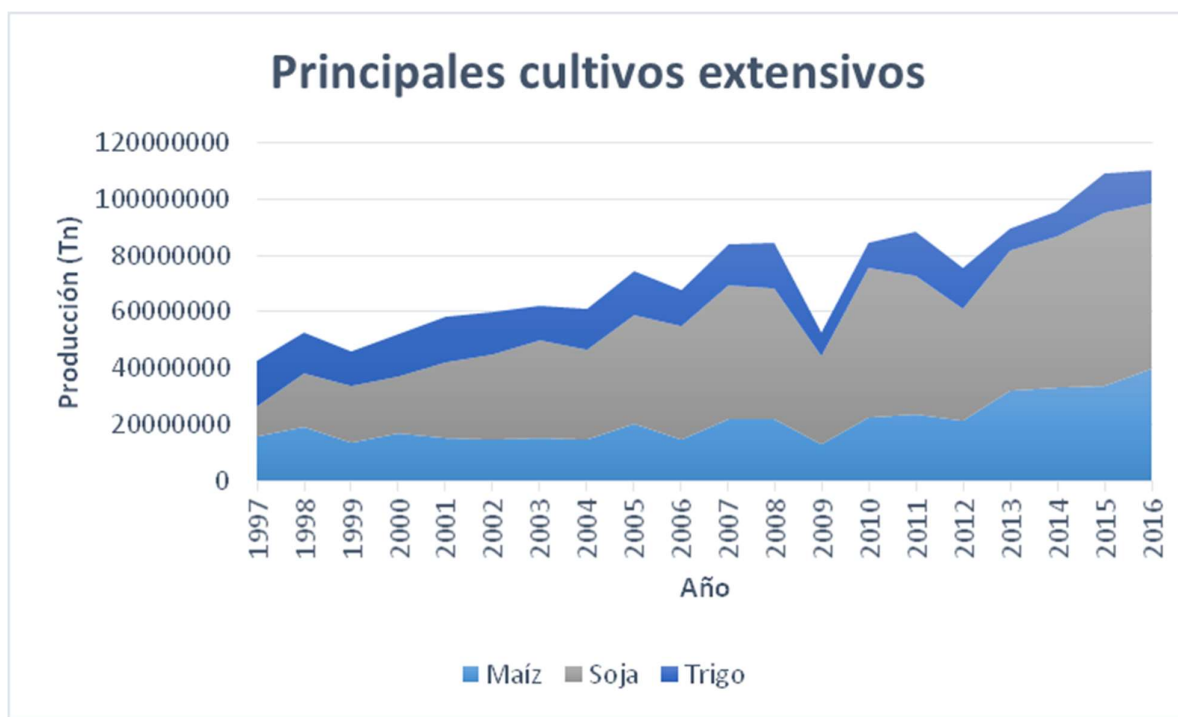
generaron distintos tipos de plaguicidas, que fueron apareciendo y sustituyéndose unos a los otros por motivos relacionados a la protección ambiental o al desarrollo de resistencia en las plagas.

El primer insecticida organoclorado (dicloro difenil tricloroetano, DDT) empezó a ser utilizado para eliminar insectos vectores de enfermedades en la Segunda Guerra Mundial. Todos los insecticidas organoclorados han sido prohibidos, debido a su alta persistencia y toxicidad en innumerables especies, por el Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes (Stockholm Convention, 2008). En la década de 1960, con el surgimiento de evidencia sobre los posibles efectos ecotoxicológicos de los organoclorados, los insecticidas organofosforados y carbamatos fueron ganando terreno en el mercado de los insecticidas. Si bien estos compuestos pueden ser tóxicos de manera aguda para los operadores y no necesariamente son tan efectivos para el control de plagas, parásitos y vectores de enfermedades como los organoclorados, son más rápidamente biodegradados y menos persistentes (Walker, 2008).

Los piretroides, que combinan alta toxicidad sobre los insectos con baja toxicidad para mamíferos y mayor estabilidad se comenzaron a utilizar a partir de 1973. Sin embargo, son compuestos muy tóxicos para insectos e invertebrados acuáticos como los crustáceos (Coats *et al.*, 1989). Ya para el año 1990 los agroquímicos dominantes en el mercado mundial eran los organofosforados (43%) seguidos por los piretroides (18%) y carbamatos (16%) (Elbert *et al.*, 2008).

Para finales de la década de 1990, un nuevo modelo agroproductivo fue implementado tanto en la Argentina como en el resto del mundo. Se trató de la introducción de cultivos genéticamente modificados (GM), como la soja resistente al herbicida glifosato, o el maíz que sintetiza la toxina Bt, y las prácticas que su implementación conlleva: siembra directa, aplicación de fertilizantes y uso de

biocidas. En nuestro país este modelo llevó a importantes cambios en la distribución de las tierras, las prácticas agronómicas y los ingresos económicos derivados de la actividad agropecuaria (Arancibia, 2013), convirtiéndose estos cultivos en el eje central de la economía del país (Delvenne *et al.*, 2013). Particularmente, los cultivos de soja y maíz GM fueron beneficiados principalmente por dos grandes razones: la necesidad del mercado global de granos y alimento para alimentar animales (cerdos y peces) y la nueva demanda de exportación de biocombustibles (Pengue, 2009). En la actualidad, el monocultivo extensivo de granos y oleoginosas (maíz, trigo y soja) es la principal actividad agropecuaria de Argentina (Leguizamón, 2014). En la figura 2 se puede observar la evolución en la producción de estos tres cultivos en la Argentina.



**Figura 2: Producción de los principales cultivos extensivos (Maíz, Soja y Trigo) en Argentina.** Se observa la serie temporal desde la autorización de los organismos genéticamente modificados. La producción se expresa en Toneladas. (Fuente: elaboración propia, basado en datos del Ministerio de Agroindustria de la Nación, 2017).

La adopción del paquete tecnológico relacionado a la soja GM tuvo lugar primero en la región Pampeana, núcleo histórico de la producción agroexportadora. Cubriendo las provincias centrales de Buenos Aires, Entre Ríos, Santa Fe, Córdoba y La Pampa. La región Pampeana es una ecoregión especialmente adecuada para la agricultura y la ganadería, siendo una vasta planicie de tierra altamente productiva. Alrededor del 80 % de la producción de soja transgénica tiene lugar en esta región. Sin embargo, en los últimos años la producción se expandió hacia las provincias del norte como Chaco, Santiago del Estero y Salta (Leguizamón, 2014).

Mientras el modelo agrícola industrial basado en la biotecnología crecía en Argentina (proceso definido por Pengue (2014) como “Segunda Revolución de las Pampas”), el mundo de los plaguicidas seguía evolucionando. No sólo por el aumento del uso del herbicida glifosato, sino también por la aparición de los insecticidas sistémicos. Este tipo de insecticidas que comprende tanto al grupo de neonicotinoides como al fipronil, actualmente abarca aproximadamente la tercera parte del mercado de insecticidas mundial (Simon- Delso *et al.*, 2015).

En el sudeste de la provincia de Buenos Aires, la expansión del modelo agroindustrial es notoria, aunque en esta región la producción agropecuaria tiene características diferentes. En particular, en el partido de General Pueyrredon hubo una expansión de la superficie sembrada con soja, pasando de unas cientos a más de 20.000 Ha entre 1996 y 2015 (Ministerio de Agroindustria, 2017). Este crecimiento de la soja en el partido no produjo un efecto significativo en la superficie dedicada a la producción intensiva de las quintas del cinturón frutihortícola del partido, manteniéndose la misma en alrededor de 10.000 Ha. Los cultivos de papa, también característicos de la región, mantienen la cantidad de Ha sembradas de modo similar al año 1996, con alrededor de 8000 Ha utilizadas para tal fin (Atucha *et al.*, 2012). Es así, que en el partido, las superficies dedicadas a la siembra de soja



son similares a las dedicadas a la producción frutihortícola y al cultivo de papa en conjunto.

### **1.3. Neonicotinoides.**

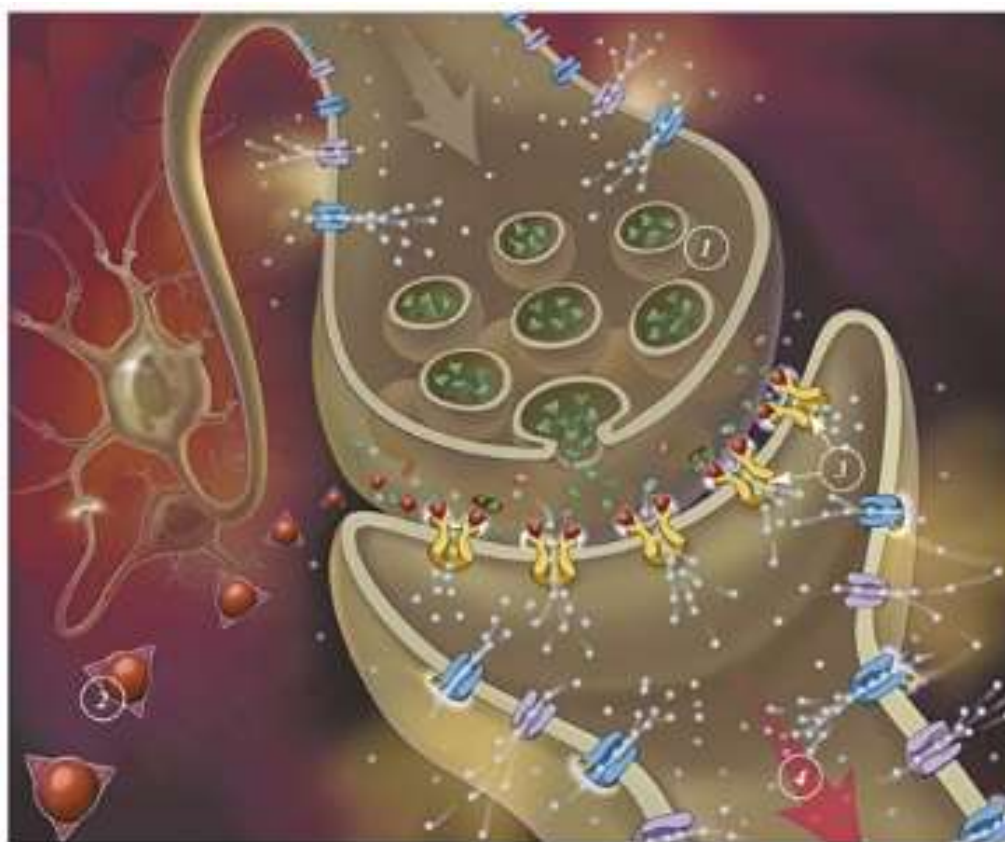
Los neonicotinoides conforman el grupo más importante de insecticidas sintéticos que ha ingresado al mercado de agroquímicos en las últimas tres décadas, siendo hoy en día el grupo de insecticidas más vendido alrededor del mundo (Tomizawa y Casida, 2003; Jeschke y Nauen, 2008). Surgieron en los años 90, y para el 2005 habían ganado el 16 % del mercado, principalmente a expensas de los organofosforados (25 %) y carbamatos (10 %). En el mismo lapso (1990 a 2005), los gastos en estos productos pasaron de 155 a 535 millones de euros anuales, aportando los neonicotinoides el 77% del total (Elbert *et al.*, 2008). Para el año 2011, los neonicotinoides estaban registrados para su uso en más de 120 países (Jeschke *et al.*, 2011). En la Tabla 1 se observar una cronología del uso de plaguicidas hasta nuestros días.

El éxito de su expansión se debe a sus características físico- químicas, amplio espectro y eficacia contra insectos plaga y su modo de acción (Elbert *et al.*, 2008). En la actualidad su predominio es evidente, ya que es utilizado en el cultivo de frutas y verduras como las manzanas, peras, frutas de carozo, cítricos, remolacha, y cultivos extensivos como caña de azúcar, papa, arroz, algodón, maíz, colza, soja y trigo, entre muchos otros (Elbert *et al.*, 2008).

Periodo	Ejemplo	Fuente	Características
1800-1920s	Primeros orgánicos, nitrofenoles, creosota, naftaleno, aceites de petróleo.	Química orgánica, derivados, producción de carbón.	Falta de especificidad, tóxicos para el usuario y organismos no blanco.
1945-1955	Organoclorados, DDT, hexaclorociclohexano, ciclodienos clorados.	Síntesis orgánica.	Persistentes, buena selectividad, propiedades agrícolas, comportamiento en salud pública, resistencia y efectos ecológicos peligrosos.
1945-1970	Inhibidores de colinesterasa, organofosforados, carbamatos	Síntesis orgánica, buen uso de la relación estructura química-actividad.	Menor persistencia, algunos con toxicidad para el usuario, algunos problemas ambientales.
1970-1985	Piretroides sintéticos, avermectina, miméticos de hormonas, plaguicidas biológicos.	Refinación de las relaciones estructura-actividad, nuevos blancos.	Algunos con baja selectividad, surgimiento de resistencias, altos costos y persistencia variable.
1985-	Organismos genéticamente modificados	Transferencia de genes de plaguicidas biológicos a otras plantas y animales. Modificaciones genéticas en plantas no blanco para resistir plaguicidas.	Posibles problemas con mutaciones y transferencias de genes, disrupción de funciones microbiológicas, monopolios
1991-	Neonicotinoides	Síntesis orgánica	Menor persistencia, sistémicos, problemas con polinizadores

**Tabla 1: Cronología del desarrollo de plaguicidas.** (Fuente: modificado de Rathore y Nollet, 2012).

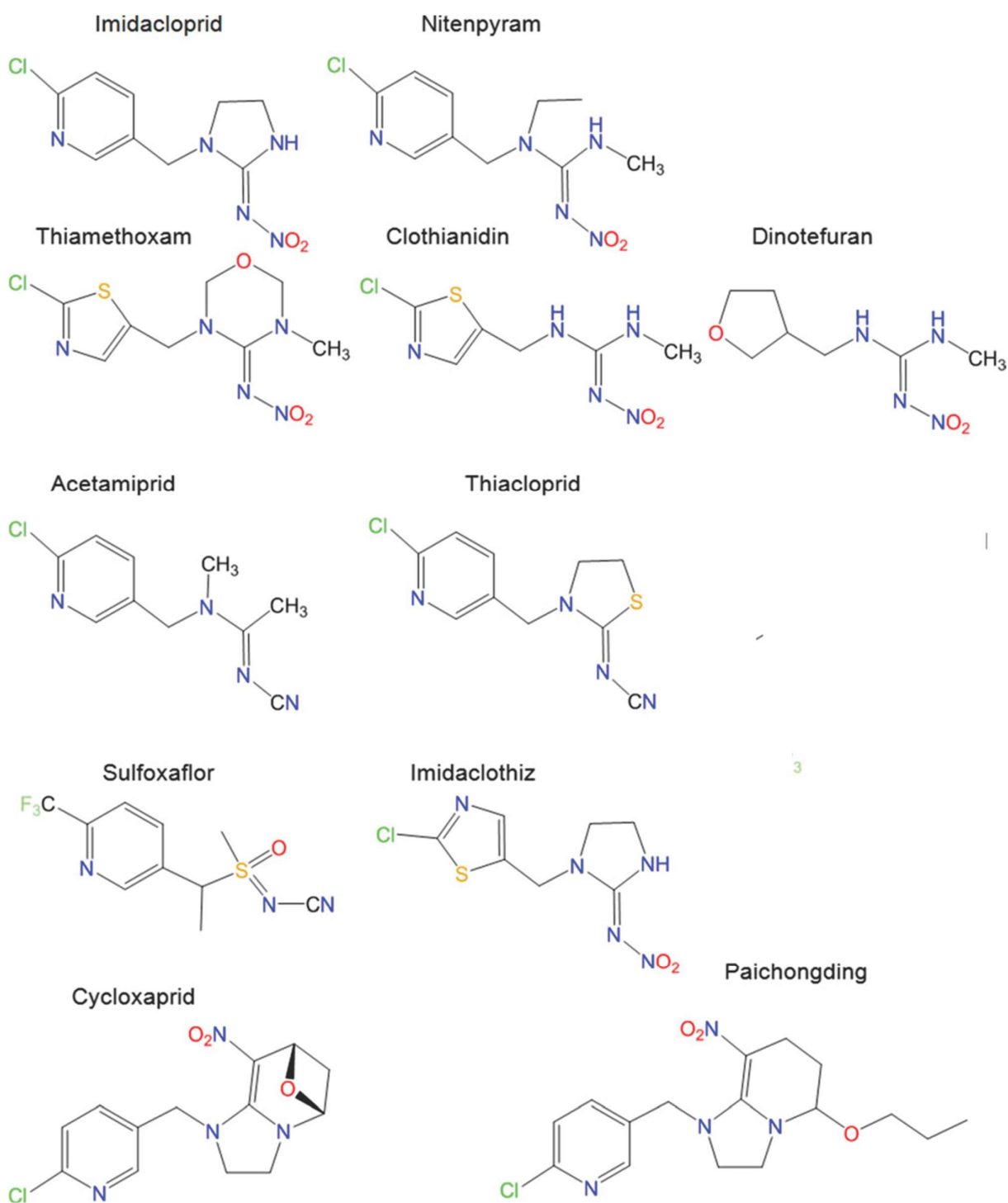
Los neonicotinoides han sido incluidos dentro de los insecticidas de “nueva generación”, y es gracias a sus características físico-químicas que se los considera dentro del grupo de insecticidas de acción sistémica (Simon-Delso *et al.*, 2015). Este grupo suele aplicarse a modo de curasemilla en cultivos extensivos, así como también se pulveriza sobre las plantas o directamente sobre el suelo previo a la emergencia del cultivo (Goulson, 2014; Bonmatin *et al.*, 2015). Actúan sobre el sistema nervioso central de los insectos “blanco”, interfiriendo con el impulso nervioso. Una vez incorporados por el insecto, estos compuestos se unen a los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) en la neurona postsináptica ejerciendo una acción agonista, provocando una activación continua del receptor y ejerciendo así un efecto neurotóxico (Gibbons *et al.*, 2015, Figura 3).



**Figura 3: Mecanismo de acción de los insecticidas neonicotinoides.** 1) Vesículas de acetil colina. 2) Imidacloprid. 3) Bloqueo de receptores nicotínicos abiertos. 4) Estimulación constante neuromuscular. (Fuente: <https://ferrebeekkeeper.wordpress.com/tag/neonicotinoid/>).

Los neonicotinoides pueden ser clasificados en tres grandes grupos: compuestos cloropiridinil (imidacloprid, nitenpiram, acetamiprid, tiacloprid), compuestos clorotiazolil (tiametoxam, clotianidina) y compuestos tetrahidrofuril (dinotefuran) (Hussain *et al.*, 2016). Posteriormente al surgimiento de este primer gran grupo de compuestos, surgieron otros como el fluorado sulfoxaflor (Watson *et al.*, 2011) o el compuesto derivado del imidacloprid sintetizado en China, denominado imidaclothiz (Zhang *et al.*, 2017). Por otro lado, ya se han sintetizado más de 600 compuestos conocidos como *cis*-neonicotinoides, algunos de los cuales poseen una comprobada acción insecticida. Dos de ellos ya se encuentran disponibles para su uso en China: el paichongding y el cicloxaprid (Shao *et al.*, 2013). En la figura 4 se observan las

estructuras químicas de los compuestos neonicotinoides disponibles en el mercado mundial de insecticidas.



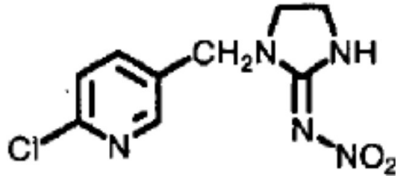
**Figura 4: Nombre comunes y estructuras moleculares de los insecticidas neonicotinoides.**  
(Fuente: modificado de Simón-Delso *et al.*, 2015).

La gran utilización de los insecticidas neonicotinoides en la agricultura resulta, en primer término, en la contaminación del suelo de los cultivos tratados y en segundo término en la transferencia de estos residuos al ambiente acuático (Sánchez-Bayo *et al.*, 2016). Su amplio uso ha suscitado preocupación sobre los efectos sobre organismos no- blanco. Mientras que las investigaciones actuales se han enfocado sobre sistemas terrestres, la escasa adsorción al suelo y su alta solubilidad en agua junto a su extensiva utilización, colocan a los ecosistemas acuáticos en alto riesgo de contaminación mediante eventos de escorrentía (Miles *et al.*, 2017). Su persistencia varía ampliamente dependiendo de las condiciones ambientales, siendo algunos factores ambientales como el pH, la temperatura, la humedad, la materia orgánica y la estructura y textura del suelo los que afectan su degradación. Otros factores que afectan su persistencia son la naturaleza del compuesto, su concentración inicial y el tipo de formulación (Hussain *et al.*, 2016).

El trabajo de Natalia y Robert (2016), mediante un enfoque de “ciclo de vida” (LCA, por “life cycle assessment”), demostró que no sólo la aplicación de este tipo de compuestos puede tener efectos sobre la salud y el medio ambiente, sino que también pueden tener efectos nocivos desde el proceso de producción.

#### **1.4. Imidacloprid.**

El imidacloprid (IMI) es un insecticida sistémico y de contacto utilizado para el control de plagas principalmente en cultivos vegetales (Navalón *et al.*, 1997). Se trata de un compuesto hidrofílico y de baja volatilidad (IUPAC PPDB, 2017). Las principales características físico-químicas del IMI se pueden observar en la tabla 2:

Nombre común	IMIDACLOPRID
Nombre IUPAC	1- ( 6-Cloro-3-piridilmetil)-N- nitroimidazolidin-2-ilideneamina
CASRN	138261-41-3
Fórmula molecular	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> ClN <sub>5</sub> O <sub>2</sub>
Peso molecular	255,7
Estructura	
Solubilidad en H <sub>2</sub> O	610 mg/ L (a 20 °C)
K <sub>oc</sub>	248
Presión de vapor	2 x 10 <sup>-7</sup> Pa (a 20 °C)
Log K <sub>ow</sub>	0,57

**Tabla 2: Principales características físico-químicas del insecticida neonicotinoide imidacloprid.**

CASRN: número de registro en el “Chemical Abstracts Service”, K<sub>oc</sub>: coeficiente de adsorción de carbono orgánico, Log K<sub>ow</sub>: logaritmo de la coeficiente de partición octanol- agua. (Fuente: modificado de Roberts and Hutson, 1999).

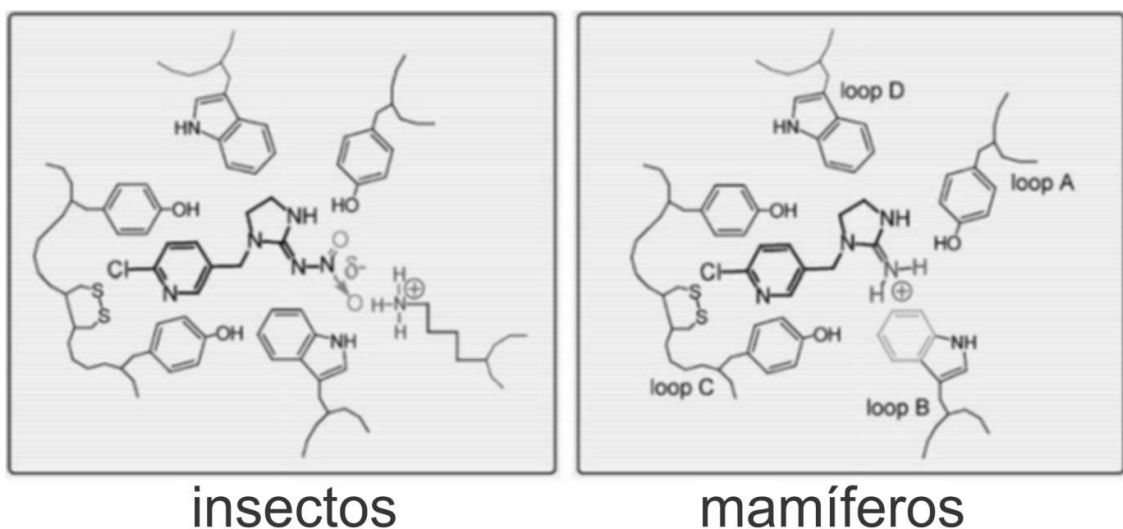
El IMI es utilizado para controlar insectos chupadores, del suelo, termitas y algunos insectos masticadores. Es aplicado en semillas, suelo, cultivos y estructuras, como así también en jardinería y tratamiento tópico para el control de pulgas en mascotas domésticas (Fossen, 2006). Ingresó al mercado mundial de los insecticidas en el año 1991, introducido por la compañía Bayer (Leverkusen, Alemania; Jeschke *et al.*, 2011). Este insecticida se patentó en el año 1985 (Zabar *et al.*, 2012), y al expirar los derechos exclusivos en el año 2005, se masificó su producción y utilización en todo el mundo (USDA, 2005). El IMI es comunmente utilizado en Paraguay y Brasil como curasemilla, y también es aplicado como spray junto a insecticidas piretroides (Hunt *et al.*, 2016). Para el año 2010, las ventas de IMI en Brasil alcanzaron las 11.934

toneladas, principalmente para su uso en el cultivo de la caña de azúcar (Ansoar-Rodriguez *et al.*, 2015).

Para el año 2017, en Argentina están autorizados más de 200 formulados con el principio activo IMI para protección de cultivos, tanto solo como combinado con otros insecticidas o fungicidas (SENASA, 2017). En la provincia de Buenos Aires, es aplicado como curasemilla en cultivos extensivos como soja, sorgo, trigo, maíz y girasol, en tanto que es aplicado de manera eventual en el cultivo de papa en el sudeste bonaerense y muy frecuentemente en cultivos de hortalizas de hoja y fruto, tanto en el cordón frutihortícola del partido de General Pueyrredón como en el de La Plata (OPDS, 2013).

Es así como la aplicación de IMI ha crecido tanto en la región como en el mundo, constituyendo hoy en día uno de los insecticidas más vendidos en el mundo (Simon-Delso *et al.*, 2015). Este crecimiento en su uso, así como sus diferentes formas de aplicación hacen del IMI un compuesto muy presente en la agricultura tanto argentina como regional.

Como fue mencionado en la sección anterior, como todo insecticida neonicotinoide, el IMI actúa sobre los nAChR en insectos blanco. Estudios *in vitro* han demostrado que las interacciones electrostáticas del grupo nitroimino y el nitrógeno 1 del grupo del grupo 2- nitroimino- imidazolidin del IMI con residuos de aminoácidos particulares de los nAChR, cumplen un rol determinante en la toxicidad selectiva de este insecticida (Tomizawa y Casida, 2003, Figura 5). Estas interacciones resultan de diferente intensidad, siendo mayores en insectos que, por ejemplo, en vertebrados. Debido a que la intensidad de interacción define la intensidad del efecto del compuesto, el IMI posee cierta seguridad para su aplicación y sus posibles efectos en organismos no blanco (Tomizawa *et al.*, 2000).



**Figura 5: Modelo hipotético específico del sitio de unión del insecticida imidacloprid.** Se propone la unión de imidacloprid con el sitio agonista de receptores nAChR, tanto de insectos como de mamíferos. (Fuente: modificado de Tomizawa y Casida, 2005).

Pese a que el IMI no fue desarrollado para ser aplicado en el agua, este puede llegar a los cuerpos de agua por la deriva de la pulverización (Tisler *et al.*, 2009). Existen diversos informes acerca de la presencia de IMI en cuerpos de agua dulce alrededor del mundo. Starner y Goh (2012) realizaron un monitoreo en distintas regiones agrícolas de California (Estados Unidos), donde encontraron valores máximos en aguas superficiales de 3,29  $\mu\text{g/L}$ , con frecuencias de detección de IMI de alrededor del 90 % de las muestras. En regiones más urbanas del mismo estado, las concentraciones encontradas fueron menores (0,70  $\mu\text{g/L}$ ), y la frecuencia de detección fue de aproximadamente 50 % (Ensminger *et al.*, 2013). También en Estados Unidos, en un monitoreo anual de ríos en el estado de Nueva York, se observó que las mayores concentraciones de IMI se detectaban luego de episodios de tormenta, posiblemente a causa de procesos de escorrentía (Phillips y Bode, 2004). En la provincia de Quebec (Canadá) Anderson *et al.* (2015), informaron concentraciones de 0,17  $\mu\text{g/L}$  en agua superficial cercana a huertas y 6,10  $\mu\text{g/L}$  en agua subterránea. En otra provincia de Canadá (Saskatchewan) Main *et al.* (2014)



encontraron concentraciones de hasta 0,26 µg/ L en humedales, siendo una posible fuente además de la aplicación del insecticida, el agua de escorrentía proveniente del deshielo y del derretimiento de la nieve del invierno inmediatamente anterior a la temporada de cultivo (Main *et al.*, 2016).

La máxima concentración de IMI encontrada en un cuerpo de agua dulce superficial fue informada en Holanda, donde se encontraron 320 µg/ L IMI (Van Dijk *et al.*, 2013). En Suecia, un relevamiento exhaustivo de agroquímicos (126 principios activos) en cuerpos de agua aledaños a regiones agrícolas reveló valores máximos de 15 µg/ L, valor 21 veces superior a los valores guía para ese país (Kreuger *et al.*, 2010). Lamers *et al.* (2011) detectaron niveles relativamente bajos de IMI en agua superficial de Vietnam (< 0,19 µg/ L), aunque encontraron niveles de IMI mayores a los permitidos para agua de bebida en agua subterránea (1,53 µg/ L). Sanchez-Bayo y Hyne (2014) relevaron la presencia de neonicotinoides en distintos cuerpos de agua de los alrededores de Sidney (Australia) mediante la utilización de muestreadores pasivos. Dicho estudio mostró un rango de concentraciones cuantificables de IMI de 0,07 a 4,56 µg/ L y una frecuencia de detección del 93 %. La presencia de IMI también se ha informado en ambientes diferentes a los agroecosistemas. Por ejemplo, Yamamoto *et al.* (2012) informaron valores de IMI del orden de los 0,01 µg/ L para ríos urbanos de la ciudad de Osaka (Japón), en tanto que Smith *et al.* (2012) informaron concentraciones de hasta 0,08 µg/ L IMI en la Gran Barrera de Coral (Australia).

En la Argentina, existen pocos trabajos que den cuenta de las concentraciones de IMI en cuerpos de agua superficiales. Uno de ellos, que estudia cuatro subcuencas de diferentes provincias, informa valores trazas del insecticida por debajo del límite de cuantificación (De Gerónimo *et al.*, 2014). Pero, por otro lado, el mismo trabajo revela la presencia de IMI en el 43 % de las muestras tomadas en el sudeste de la

provincia de Buenos Aires, así como en el 20 % de las muestras de agua de la provincia de Misiones. Más recientemente, Perez *et al.* (2017) detectaron IMI en 93,33 % en sucesivos muestreos de agua superficial del arroyo El Crespo en el partido de Balcarce, Prov. Bs. As.

Ensayos experimentales han encontrado que el IMI es estable en agua en condiciones ácidas o neutras, pero puede hidrolizarse en condiciones alcalinas. Tanto su hidrólisis como la fotólisis pueden producir distintos metabolitos (Zheng y Liu, 1999).

El metabolismo de IMI en el suelo genera como subproductos principales imidacloprid urea, ácido 6-hidroxinicotínico y ácido 6-cloronicotínico (Rouchaud *et al.*, 1994). En tanto que en aguas superficiales, los principales productos de degradación se originan por fotólisis, dando lugar a la formación de imidacloprid urea, 6-cloronicotínalaldehído, 6-cloro- N- metilnicotinácidoamida y 6-cloro- 3- piridil-metiletilendiamina (Moza *et al.*, 1998).

Respecto a su biotransformación, el mismo fue estudiado tanto en modelos animales como vegetales. En ratones, los metabolitos observados en cerebro, hígado y orina llegan a la decena, ocho de ellos provienen del grupo cloropiridinil y dos del fragmento nitroguanidina (Ford y Casida, 2006). Debido a implicancias toxicológicas que serán abordadas en la próxima sección, el metabolismo de IMI fue estudiado en abejas. En dichos organismos se encontró la metabolización de IMI a 5-hidroxi imidacloprid y a IMI en su forma de olefina (Suchail *et al.*, 2004). Por otra parte, en plantas se ha comprobado que el IMI se transloca por los tejidos vasculares y hacia otros tejidos (tanto en sentido basipetal como acropetal), y los metabolitos que se generan dependen de la especie, siendo las características generales del proceso similares (Sur y Stork, 2003; Ford y Casida, 2008).

### **1.5. Efecto de los neonicotinoides sobre la biota.**

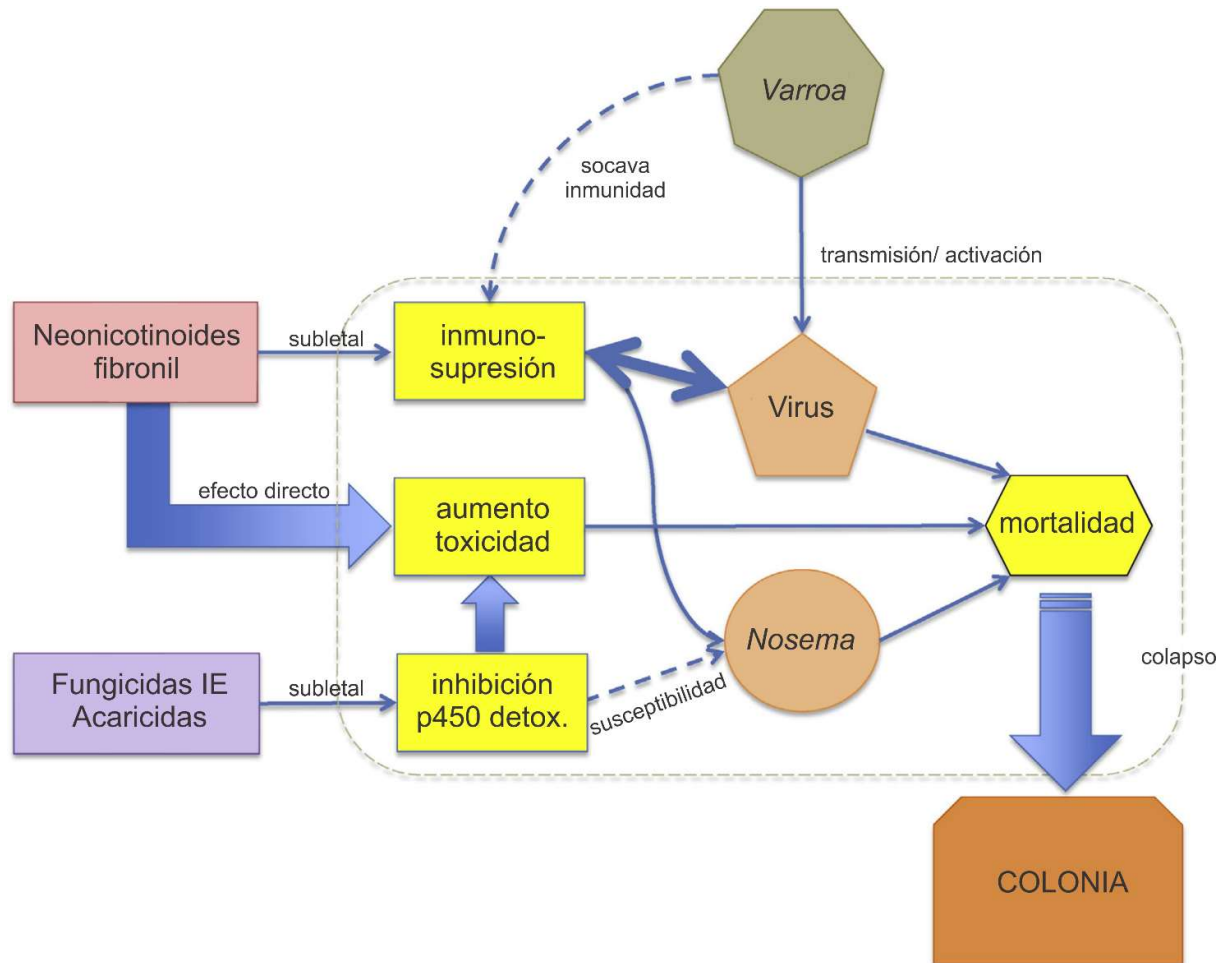
En áreas agrícolas, los pesticidas son los mayores estresores en ecosistemas dulceacuícolas y tienen potenciales efectos adversos en las comunidades acuáticas (Bunzel *et al.*, 2014). Se prevé que el uso mundial de plaguicidas se duplicará para el año 2050, lo que, junto con la intensificación agrícola, podría dar lugar a pérdidas sin precedentes tanto en los servicios de los ecosistemas como en la riqueza de especies (Tilman *et al.*, 2001). La atención sobre el papel de los plaguicidas que afectan a las poblaciones de vertebrados de vida silvestre se han centrado recientemente en productos sistémicos que ejercen una toxicidad de amplio espectro (Gibbons *et al.*, 2015), entre ellos los neonicotinoides.

En el año 2013, la Comisión Europea adoptó la propuesta N° 485 (Reglamento de Ejecución de la Comisión, en inglés Commission Implementing Regulation N° 485/2013) de restringir el uso de plaguicidas neonicotinoides incluyendo los principios activos IMI, clotianidina y tiametoxam, por un periodo de dos años (desde 2013 a 2015). La decisión se basó en el reporte de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, por el inglés European Food Safety Authority), el cual incluye la evaluación de efectos de estos compuestos en abejas (EFSA, 2013). Durante este periodo se buscó recabar evidencias científicas relacionadas a los posibles efectos tóxicos de estos compuestos en organismos no- blanco. Este proceso de reevaluación de estos tres compuestos también ha sido imitado en Canadá, por la Agencia Regulatoria de Administración de Plaguicidas (PMRA, por el inglés Pest Management Regulatory Agency; Anderson *et al.*, 2015).

La principal controversia que buscaba resolver esta resolución, es la posibilidad de que estos compuestos afecten a los organismos polinizadores. Al momento de escritura de la presente tesis, aún existe esta controversia en el mundo científico acerca del rol de los neonicotinoides en el desorden de colapso de colmena (DCC)

(van Engelsdorp y Meixner, 2010; Bacandritsos *et al.*, 2010) y otros posibles efectos en polinizadores (para una revisión completa ver van der Sluijs *et al.*, 2013). El DCC se caracteriza por pérdida de abejas en la colmena durante el invierno, y esa poca o nula cantidad de individuos en la población de abejas adultas lleva a la desaparición de las obreras y/ o al fracaso reproductivo de la reina (van Engelsdorp *et al.*, 2009). Existen numerosos estudios que discuten si los neonicotinoides tienen relación con el DCC (Oldroyd *et al.*, 2007; Alaux *et al.*, 2010; Vidau *et al.*, 2011). En particular, Sanchez- Bayo *et al.* (2016) propone dos vías por la que los neonicotinoides se ven involucrados en la mortalidad de las abejas (Figura 6). Por un lado, afectan la respuesta inmune de las abejas ante hongos o virus transmitidos por el ácaro *Varroa sp.* Por otro lado los fungicidas afectan la actividad de las enzimas citocromo p450, aumentando la toxicidad directa de los neonicotinoides. Ambos procesos aumentan la mortalidad de las abejas, provocando en última instancia el colapso de la colmena. Si bien la propuesta expuesta anteriormente explica la interacción entre patógenos y estresores químicos, no hay consenso en la comunidad científica acerca de la mecánica o causalidad entre la exposición a neonicotinoides y efectos tóxicos en las abejas. Tennekes y Sanchez- Bayo (2011) sostienen que la toxicidad directa del IMI en abejas se debe a la unión virtualmente irreversible del IMI con los receptores nicotínicos de manera tiempo- dependiente. En este caso, se trataría de una acumulación de efecto, debido a que en exposiciones sucesivas hay cada vez más receptores ocupados por IMI. Por otro lado las abejas pueden estar expuestas a insecticidas neonicotinoides por distintas vías, y la toxicidad de estos compuestos depende tanto de la vía de exposición (ingestión de néctar, exposición tópica, etc.), la especie, el rango de forrajeo, la fenología y el tiempo de vuelo durante el día (van der Sluijs *et al.*, 2013).

Finalmente, al momento de la escritura de esta tesis, estos tres compuestos continúan prohibidos en la Unión Europea y aún se siguen recabando datos para su evaluación de riesgo. Blacquiere y van der Steen (2017) sostienen que aunque los neonicotinoides estén relacionados con el DCC, aún no ha transcurrido el suficiente tiempo para evaluar si la prohibición de 2013 ha surtido efecto en la recuperación de los polinizadores.



**Figura 6: Interacciones entre plaguicidas, parásitos y patógenos estresores en relación al desorden de colapso de colmena.** Los procesos dentro del recuadro de línea punteada corresponden a procesos a nivel individuo. IE: inhibidores de ergosterol. (Fuente: modificado de Sanchez- Bayo *et al.*, 2016).

Además de los polinizadores, existen en la literatura diversas evidencias de efectos tóxicos en invertebrados acuáticos. El IMI es, con mucho, el neonicotinoide más estudiado, con diferencias en sensibilidad entre especies de invertebrados acuáticos

de varios órdenes de magnitud. De las especies estudiadas, los insectos pertenecientes a los órdenes Ephemeroptera, Trichoptera y Diptera parecen ser los más sensibles, mientras que los de Crustacea (aunque no universalmente) son menos sensibles (Morrisey *et al.*, 2015). En organismos modelos y tomando como parámetro de toxicidad la letalidad, el IMI es más tóxico para el anfípodo *Hyalella azteca* que para la pulga acuática *Daphnia magna*, y aún más tóxico para el mosquito *Chironomus tentans* (Jemec *et al.*, 2007). En el anfípodo *Gammarus pulex*, la exposición a IMI produce reducción en la movilidad y mortalidad por la suma de la acción directa del insecticida y la inanición de los especímenes (Nyman *et al.*, 2013). En otra especie de anfípodo (*Gammarus fossarum*), se encontró que tanto el IMI como su metabolito ácido 6-cloronicotínico causan estrés oxidativo (Malev *et al.*, 2012). Estudios en mesocosmos artificiales que simulan corrientes de agua como arroyos, demostraron que pulsos de IMI redujeron la abundancia de invertebrados y la diversidad de la comunidad. Estos resultados se correlacionaron con efectos en la descomposición de la hojarasca (Pestana *et al.*, 2009).

La pérdida de abundancia y diversidad de invertebrados acuáticos genera problemas a nivel comunidad. En estudios de campo a gran escala llevados a cabo en Holanda, Hallmann *et al.* (2014) observaron que las poblaciones de aves insectívoras se reducían cuando las concentraciones de IMI eran mayores en los cuerpos de agua. Complementariamente a este tipo de efectos “bottom- up” (desde la base a la cima de la trama trófica), se han observado efectos “top- down” (desde la cima hacia debajo de la trama) de los neonicotinoides. Es así como la reducción de macroinvertebrados predadores como libélulas y chinches por acción de la clotianidina, aumentan la población de las presas (Miles *et al.*, 2017).

Aunque se han planteado preocupaciones acerca de los efectos directos de los neonicotinoides en especies de vertebrados no blanco, en general se cree que los

neonicotinoides son menos dañinos para los vertebrados que para los insectos (Hallman *et al.*, 2014). Esta hipótesis se basa en el hecho previamente mencionado de que los neonicotinoides tienen mayor afinidad por los receptores de invertebrados que de vertebrados, pero dejan de lado el hecho de que un compuesto puede ser tóxico no sólo por su mecanismo de acción contra las plagas.

Hoy en día existe una falta de información importante acerca de la toxicidad de neonicotinoides en peces, y la existente deriva de las hojas de seguridad de las formulaciones comerciales de insecticidas, y es por lo tanto, información resumida (Anderson *et al.*, 2015). En general, las concentraciones letales 50 % (CL<sub>50</sub>) a 96 h y las menores concentraciones con efectos observados (LOEC, del inglés Lowest Observed Effect Concentration) en la literatura, están en el rango de los miligramos o gramos por litro (Anderson *et al.*, 2015). En el pez cebra (*Danio rerio*), el IMI no produce toxicidad en sus embriones incluso en altas concentraciones como 320 mg/L, aunque al exponer al mismo pez al formulado comercial de IMI “Confidor SL”, la toxicidad en los adultos es mayor (Tisler *et al.*, 2009).

Como se ha mencionado anteriormente los neonicotinoides se incorporan y distribuyen en las plantas, pudiendo alcanzar prácticamente todos los tejidos vegetales (ver sección 1.4.). Es así como se han encontrado concentraciones cuantificables de estos compuestos tanto en los cultivos a los que se les aplica como en la vegetación marginal (Goulson, 2014). En cuanto a la toxicidad del IMI en organismos fotosintéticos, la información disponible se limita a la letalidad en algas, con una concentración inhibitoria del crecimiento para el alga *Desmodesmus subspicatus* de 389 mg/L (Tisler *et al.*, 2009), siendo el ácido 6-cloronicotínico más tóxico que el compuesto parental para esta especie (Malev *et al.*, 2012). En plantas vasculares, no sólo existe una ausencia de información acerca de los efectos subletales del IMI, sino que los datos existentes sólo se refieren a su genotoxicidad

en especies modelo (Bianchi *et al.*, 2016; Ansoar- Rodríguez *et al.*, 2015).

### **1.6. Peces y macrófitas acuáticas como biomonitores.**

Los organismos acuáticos suelen ser más sensibles a los compuestos tóxicos que los organismos terrestres (por ejemplo, mamíferos terrestres) y pueden proveer datos experimentales para la evaluación de efectos subletales de estos compuestos (Valavanidis *et al.*, 2006). Sin embargo, los efectos tóxicos en los organismos suelen ser especie- específica (Cabrita *et al.*, 2011), y en muchas ocasiones algunas especies terrestres resultan más sensibles que las acuáticas.

En particular, la toxicidad de los compuestos contaminantes en los peces es la culminación de una serie de eventos que involucran procesos físicos, químicos y biológicos. Este grupo de organismos puede ingerir los contaminantes por ingestión de alimento y/ o por contacto de sus superficies respiratorias y piel con el agua contaminada. Una vez incorporados los compuestos, estos se distribuyen dentro del pez y algunos alcanzan sitios de acción donde generan efectos tóxicos (Di Giulio y Hinton, 2008). Por otro lado los peces cumplen un rol ecológico importante en las cadenas alimentarias por su función de trasladar energía desde niveles tróficos bajos a otros más altos (van der Oost *et al.*, 2003). Se los encuentra en todos los compartimentos del medio ambiente acuático y tienen la capacidad de reaccionar sensiblemente a los cambios ambientales. En los últimos años, los peces han atraído un interés considerable en los estudios que evalúan respuestas biológicas y bioquímicas, incluyendo la genotoxicidad ante la presencia de contaminantes ambientales. Es por todos estos motivos que los peces se han convertido en un grupo de organismos apropiados como biomonitores de los ecosistemas acuáticos (den Besten y Munawar, 2005; Torres de Lemos *et al.*, 2007).

La mayoría de las pruebas de toxicidad utilizadas para regular la liberación de



sustancias químicas en el medio ambiente han utilizado animales como especies de ensayo, con el supuesto erróneo de que los niveles tóxicos que protegen a los peces o invertebrados son también protectores de las plantas. Además, en las pruebas de toxicidad en plantas, se utilizan mayormente plantas de cultivo terrestres, mientras que las pocas especies fotosintéticas acuáticas ensayadas han sido principalmente algas de agua dulce (Lytle y Lytle, 2001).

En los últimos años ha comenzado a utilizarse una mayor variedad de especies fotosintéticas acuáticas (algas y macrófitas) y sus respuestas para establecer criterios de calidad ambiental, para evaluar la toxicidad de aguas superficiales y efluentes, y para informar el riesgo de químicos en los ecosistemas (Brooks *et al.*, 2015). La inclusión de macrófitas acuáticas en ensayos ecotoxicológicos ha comenzado a complementar el uso de datos de toxicidad de algas de agua dulce, ya que estas últimas han demostrado ser menos sensibles que las plantas vasculares a los efectos de los contaminantes (Lewis, 1995).

Las plantas vasculares o macrófitas habitan en una amplia variedad de nichos y prestan numerosos servicios ecosistémicos en los ambientes de agua dulce y costeros. Entre sus funciones en el ecosistema, las plantas acuáticas ayudan a estabilizar el sedimento tanto en lagos como en aguas fluyentes, y su presencia afecta las velocidades de sedimentación, velocidad de flujo, absorción de nutrientes y recirculación. Además, proporcionan refugio para insectos, crustáceos y peces, y actúan como sustratos para microorganismos de superficie, caracoles y organismos que se alimentan de epífitas (Cedergreen y Streibig, 2005). Es por esto que los efectos de la contaminación sobre las macrófitas pueden afectar negativamente a todo el ecosistema acuático. Las macrófitas son sedentarias, fácilmente reconocibles, de fácil recolección en el campo y la concentración de contaminantes en sus tejidos refleja la contaminación del ambiente al que pertenecen (Lewis, 1995). Todas estas

características hacen de las macrófitas buenos monitores ambientales. Pese a estas características, los datos de fitotoxicidad en plantas acuáticas han desempeñado un papel relativamente menor en la toma de decisiones para la evaluación del riesgo relativo al peligro ambiental de la mayoría de los contaminantes potenciales (Lewis, 1995).

Esta tendencia se ha tratado de revertir. Tal es así que en el año 2008 se reunió el grupo de Evaluación de Riesgo para Pesticidas en Macrófitas Acuáticas (AMRAP, por el inglés “Aquatic Macrophyte Risk Assessment for Pesticides”), con expertos de la materia. A partir de esta reunión se conformó posteriormente el Grupo de Ecotoxicología de Macrófitas Acuáticas (AMEG, por el inglés “Aquatic Macrophyte Ecotoxicology Group”) dentro de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental (SETAC, por el inglés “Society of Environmental Toxicology and Chemistry”). Este grupo tiene entre sus objetivos desarrollar protocolos para la evaluación de compuestos potencialmente tóxicos en macrófitas acuáticas, así como estandarizar condiciones inter- laboratorios (Arts *et al.*, 2010). Es así como en el año 2014 y producto del trabajo desarrollado por este grupo, surgió la guía de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OECD, por el inglés “Organization for Economic Cooperation and Development”) N° 238 “Ensayo de toxicidad libre de sedimentos en *Myriophyllum spicatum*”, que marca pautas y estándares para la realización de este tipo de ensayos. (OECD, 2014).

## **1.7. *Australoheros facetus* y *Myriophyllum quitense* como biomonitores.**

### **1.7.1. *Australoheros facetus***

Entre las 160 familias que componen el orden Cichliformes, los cíclidos (familia *Cichlidae*) conforman el grupo más diversificado morfológicamente, comprendiendo alrededor de 1760 especies conocidas, pero se estima que pueden alcanzar las

2000 especies (Nelson *et al.*, 1998). Se los encuentra en África, India, Medio Oriente, Madagascar y América, habiendo al menos 400 especies descritas en Sudamérica, representando el 10 % de la ictiofauna de agua dulce de la región (Gonzalez Naya *et al.*, 2012). En contraste con su amplia distribución geográfica, y su diversificación ecológica, los cíclidos también presentan un cierto grado de endemismo (Hartz *et al.*, 1999). Los cíclidos pertenecen al tipo biológico de peces que habitan cuerpos de agua tranquilos y vegetados, y además se pueden dividir en tipo orbicular (por ejemplo, *Gymnogeophagus sp.*) y tipo predador (por ejemplo *Crenicichla sp.*) que son peces de cuerpo más elongado que los anteriores (Menni, 2004).

En la Argentina, hasta el año 2003 se conocían al menos 45 especies descritas de cíclidos (Lopez *et al.*, 2003) pero se continúan describiendo nuevas especies hasta el día de hoy.

Dentro de la familia Cichlidae, el género *Australoheros* fue descrito por Říčan y Kullander (2006) a partir del análisis de la especie conocida anteriormente como *Cichlasoma facetum*. Los autores analizaron características morfológicas y moleculares del grupo y concluyeron que se correspondían a un grupo monofilético, diferenciado de otras especies de *Cichlasoma*. Así, la especie previamente clasificada como *Cichlasoma facetum* actualmente conforma el nuevo género *Australoheros*, compuesto por aproximadamente diez especies.

El género *Australoheros* presenta un cuerpo comprimido de contorno orbicular con pedúnculo caudal corto. Las aletas pectorales son oscilantes y propulsoras, insertas verticalmente en la parte alta del cuerpo, cercanas al centro de masa corporal. Datos experimentales indicarían que las especies del género corresponden a un tipo natatorio intermedio entre especialistas de aceleración y especialistas en maniobra, siendo estas cualidades ventajosas en los espacios que habita en los cuerpos de agua (Gomez *et al.*, 2003).

De las 10 especies del género, *Australoheros facetus* (del latín *australis*: del sur, y *heros*: de la tribu *heroini*, Jenyns, 1842), conocido localmente como “chanchita” (Figura 7, clasificación taxonómica en Tabla 3), se encuentra en el sur de Brasil, Argentina y Uruguay, siendo el cíclido con distribución más austral descrito (38° 44' S) (Gonzalez Naya *et al.*, 2012). *A. facetus* típicamente habita las provincias de Buenos Aires y Entre Ríos en Argentina y el sur de Uruguay (Řičan y Kullander, 2006), y hay registros de su distribución también en el sur de Brasil (Menni, 2004). También en la década de 1950 fue introducida en lagunas del sur de Chile, donde habita las lagunas Grande y Chica de San Pedro, siendo el posible motivo de su introducción el acuarismo (Ruiz *et al.*, 1992). Ribeiro *et al.* (2009) informan su introducción en diversos ríos de Portugal, también con motivos de pesca recreativa, ornamentación y acuarismo.

Estudios citogenéticos en *A. facetus* describieron su cariotipo y su número cromosómico  $2n = 48$  (Feldberg y Bertollo, 1985; Perazzo *et al.*, 2011). Este número cromosómico es típico de la mayoría de los cíclidos del Neotrópico, que presentan un rango que va desde los 38 a los 60 cromosomas (Perazzo *et al.*, 2011).

Dominio	<i>Eukarya</i>
Reino	<i>Animalia</i>
Filo	<i>Chordata</i>
Subfilo	<i>Vertebrata</i>
Clase	<i>Actinopterygii</i> (peces con aletas radiadas)
Superorden	<i>Acanthopterygii</i>
Orden	<i>Cichliformes</i>
Suborden	<i>Labroidei</i>
Familia	<i>Cichlidae</i>
Género	<i>Australoheros</i>
Especie	<i>A. facetus</i>

Tabla 3: Clasificación Taxonómica del cíclido sudamericano *Australoheros facetus* (Nelson, 2016).

A esta especie se la puede encontrar en una amplia diversidad de ambientes, siendo

abundante en las lagunas pampásicas (Gomez *et al.*, 2003). *A. facetus* se encuentra en pequeñas pozas que se forman entre los mantos de plantas litorales; cerca de piedras y bajo ramas o troncos caídos (Ruíz *et al.*, 1992). Es una especie litoral y territorial que presenta cuidados parentales (Ringuelet, 1975). Trabajos experimentales sugieren que existe una relación positiva entre este pez y las plantas flotantes libres, por ejemplo el camalote *Eichhornia crassipes* (Meerhoff *et al.*, 2003).



Figura 7: Espécimen del cíclido *Australoheros facetus*. (Longitud total= 7 cm).

Respecto a la dieta de *A. facetus*, diversas publicaciones dan cuenta que el mismo es un pez omnívoro, pero con cierta tendencia a la carnivoría. Ringuelet (1975) estableció que la especie tiene hábitos alimentarios micro y meso animalívoros. Posteriormente Gutierrez *et al.* (1986) presentaron un trabajo exhaustivo de su dieta en ríos y lagunas pampásicas y describieron que se alimenta de organismos asociados a la vegetación litoral, siendo las larvas de quironómidos y copépodos los ítems más importantes. Cuando se lo encuentra en lagunas, consume presas más grandes que en el río, pudiendo los peces mayores a 70 mm comer camarones y peces, por ejemplo, del género *Cnesterodon*. Yafe *et al.* (2002) determinaron que la dieta de *A. facetus* en lagunas antropizadas de Uruguay consiste mayormente de

insectos (principalmente larvas y pupas de quironómidos), peces (*Cnesterodon decemmaculatus*), y plantas (algas, perifiton y macrófitas), pudiendo los organismos más grandes llegar a consumir ejemplares del camarón de agua dulce *Palaemonetes argentinus*. Más recientemente se volvió a evidenciar que la especie ingiere larvas de insectos y peces (Fernandez *et al.*, 2012). El hecho de que *A. facetus* presente una alimentación tan variada abarcando toda la cadena trófica en el ambiente en que se encuentra, hace que esta especie sea un excelente bioindicador ambiental (Noguez- Piedras *et al.*, 2006).

Por otro lado, *A. facetus* es un importante ítem alimentario para otros peces piscívoros y aves, como por ejemplo el biguá *Phalacrocorax olivaceus* (Gonzalez Naya *et al.*, 2012).

*A. facetus* es utilizado en bioensayos por su facilidad de manipulación, y su buena adaptación al cautiverio (Gonzalez Naya *et al.*, 2012). Gomez y Gonzalez Naya (2007) determinaron el máximo nivel letal incipiente (NLI) de salinidad en la especie, mediante bioensayos de toxicidad aguda (96 h) bajo condiciones controladas de salinidad y temperatura. En dicho trabajo se determinó que el NLI de *A. facetus* es de 20,20 g/ L, siendo esta una tolerancia alta a la salinidad. Considerando los valores bajos de salinidad (0,5- 10 g/ L) de las aguas continentales neotropicales donde ellos viven, los autores consideran que su alta tolerancia a la salinidad es un carácter de poco o ningún valor adaptativo, y puede ser considerado como un relicto fisiológico de sus ancestros marinos.

*Australoheros facetus* ha sido utilizado como modelo biológico para la realización de ensayos toxicológicos de diversas sustancias. Perú *et al.* (2003) realizaron la evaluación de efluentes de papeleras en arroyos periurbanos de la provincia de Buenos Aires, exponiendo a especímenes adultos de *A. facetus* a diluciones de dichos efluentes, y cuantificando variaciones en parámetros bioquímicos en sangre

de los peces expuestos. Bulus Rossini y Ronco (2004) realizaron ensayos de letalidad aguda con la especie, exponiéndola a cadmio, cobre, cromo, mercurio y zinc. También se han utilizado alevines de *A. facetus* para evaluar la toxicidad de compuestos inorgánicos, por ejemplo nitritos y amonio no ionizado, en exposición aguda a 96 horas (Noguez Piedras *et al.*, 2006). Más recientemente la especie ha sido utilizada para ensayar efectos subletales de la exposición al cadmio, como enzimas antioxidantes en hígado, branquia, y cerebro (Crupkin y Menone, 2013). También se ha evaluado el efecto en estas respuestas bioquímicas ante la exposición al insecticida organoclorado endosulfán, así como también el daño al ADN (Crupkin *et al.*, 2013).

#### 1.7.2. *Myriophyllum quitense*.

La especie *Myriophyllum quitense* (Figura 8, clasificación taxonómica en Tabla 4) fue definida como tal por Orchard (1981), a partir de la especie *Myriophyllum elatinoides* definida por Fernald (1919). Se trata de una hierba acuática, con tallos débiles, que flota sumergida en la columna de agua con sólo las puntas emergentes. Puede ser no ramificada o ramificarse sólo en la parte superior, y sus hojas sumergidas se encuentran en verticilos ovales. Pueden desarrollar inflorescencias como una espiga simple emergente, con flores unisexuales, encontrándose las masculinas en la parte superior y las femeninas por debajo (Orchard, 1981).

Dominio	<i>Eukarya</i>
Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	<i>Saxifragales</i>
Familia	<i>Haloragaceae</i>
Género	<i>Myriophyllum</i>
Especie	<i>M. quitense</i>

Tabla 4: Clasificación taxonómica de la macrófita acuáticas *Myriophyllum quitense*.



*Myriophyllum quitense* se distribuye en diversos países de Sudamérica continental (Argentina, Bolivia, Chile, Colombia, Perú, Uruguay y Venezuela) como también en las islas Malvinas (Orchard, 1981). También ha sido registrada entre otras especies del género, en cuerpos de agua de Norteamérica, en los estados de Arizona, California, Idaho, Oregon, Utah, Washington y Wyoming al oeste de Estados Unidos (Couch y Nelson, 1988) y en estados tanto del oeste (British Columbia; Ceska *et al.*, 1986) como del este (New Brunswick; McAlpine *et al.*, 2007) de Canadá.



**Figura 8: Especímenes de *Myriophyllum quitense* en el laboratorio**

Otras especies del género que habitan el hemisferio norte han sido muy utilizadas en estudios ecotoxicológicos como de remediación de cuerpos de agua. A modo de ejemplo, se han ensayado los efectos de metales pesados (Ngayila *et al.*, 2009) o la remediación de los mismos (Krayem *et al.*, 2016) en *Myriophyllum alterniflorum*, especie originaria de Europa. Sin embargo, la especie más utilizada del género para ensayos de toxicidad en contaminantes acuáticos ha sido *Myriophyllum spicatum*, proveniente de Europa y Asia, pero distribuída desde el siglo XIX en Norteamérica



(Nichols y Shaw, 1986). Es así como en la literatura se pueden encontrar por ejemplo, estudios de toxicidad de herbicidas (Nuttens *et al.*, 2016), amonio (Apudo Apudo *et al.*, 2016) o alguicidas (Gross *et al.*, 1996); y de remediación de metales pesados (Keskinan *et al.*, 2003) o nutrientes como fósforo, amonio o nitratos (Moore *et al.*, 2016).

Sin embargo estas especies no son representativas de los cuerpos de agua de Sudamérica. Es así que en los últimos años se ha destacado la utilización de *M. quitense* entre otras especies autóctonas para su utilización en ensayos de toxicidad (Menone *et al.*, 2015). Sobre esta especie, existen estudios de efectos de metales pesados, eutrofización y plaguicidas (Nimptsch *et al.*, 2005; Garanzini y Menone, 2015).

### **1.8. Biomarcadores.**

La Academia Nacional de Ciencias de Estados Unidos define el término “biomarcador” como una variación inducida por un agente en componentes celulares o bioquímicos, procesos, estructuras, o funciones que se pueden medir en un sistema biológico o en una muestra del mismo (NRC, 1987). Este tipo de variaciones van desde, por ejemplo, actividades enzimáticas a la formación de compuestos biogénicos específicos, efectos en el ADN entre otros. Más allá de los efectos de xenobióticos, los cambios en los biomarcadores pueden ser causados por una amplia variedad de factores de estrés, tanto naturales como provocadas por el hombre (Peakall, 1992).

Esta definición de la década de 1980, adoptó también una clasificación de los biomarcadores. Es así que se los puede clasificar en biomarcadores de exposición (dan información de que efectivamente un organismo estuvo expuesto a un compuesto, biomarcadores de daño (el compuesto provocó una respuesta en el organismo) y biomarcadores de susceptibilidad (características de los organismos

que podrían modificar su respuesta ante una exposición a un contaminante). Idealmente, los biomarcadores permitirían explicar la conexión entre la exposición a un xenobiótico y el posible efecto en la salud de un organismo (NRC, 1987).

Posteriormente, McCarthy y Munkittrik (1996) reestructuraron esta definición, definiendo a un biomarcador como una variación inducida antropogénicamente en componentes, procesos, estructuras o funciones bioquímicas, fisiológicas y ecológicas medibles en una muestra o sistema biológico.

En la actualidad, los biomarcadores en peces se convirtieron en herramientas útiles en varias etapas del proceso de Evaluación del Riesgo Ecológico (ERA, por el inglés Ecological Risk Assessment) de contaminantes: evaluación del daño, la exposición y el peligro, la caracterización o clasificación del riesgo y el monitoreo de la calidad ambiental de los ecosistemas acuáticos (van der Oost *et al.*, 2003).

Por otro lado, un número cada vez mayor de estudios han utilizado biomarcadores bioquímicos y fisiológicos para evaluar los efectos tóxicos en las plantas. Estos efectos son a menudo más sensibles que parámetros clásicos (biomasa, crecimiento), pero su relevancia ambiental y su relación con el impacto de los contaminantes con estos parámetros no son aún del todo conocidos (Lytle y Lytle, 2001).

Basándonos en la magnitud y patrón de la respuesta de los biomarcadores, las diferentes especies que se encuentran en el ambiente tienen el potencial de servir como centinelas, demostrando la presencia de contaminantes biodisponibles y el grado de exposición. Asimismo pueden funcionar como subrogantes de la exposición y/ o daños en el hombre, prediciendo efectos a largo plazo y en la salud integral del ecosistema (van der Oost *et al.*, 2003).

## 1.9. Estrés Oxidativo

La paradoja de la vida aeróbica, o la "Paradoja del oxígeno", se define por el hecho de que los organismos eucariotas aeróbicos superiores no pueden existir sin oxígeno, pero el oxígeno es intrínsecamente peligroso para su existencia (Davies, 2000).

Un radical se define como cualquier átomo o molécula con uno o más electrones no apareados. Los radicales están formados por la pérdida o ganancia de un electrón de un no radical. La naturaleza bi-radical de la molécula de oxígeno permite reacciones de oxidación/ reducción. La reducción tetravalente del oxígeno, catalizada por la citocromo oxidasa al final de la cadena de transporte de electrones mitocondriales, produce agua. Sin embargo, la reducción monovalente genera varios intermedios reactivos (especies reactivas del oxígeno, ERO; Martínez- Álvarez *et al.*, 2005). En la tabla 5 se pueden observar las ERO:

Radicales Libres	No radicales
ROO· radical peróxido	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> peróxido de hidrógeno
OH· radical hidroxilo	O <sub>2</sub> Oxígeno singulete
O <sub>2</sub> ·- anión superóxido	OH- ión hidroxilo

Tabla 5: Especies reactivas del oxígeno

Existen evidencias experimentales de que los organismos vivos usan los radicales libres y ERO para obtener efectos biológicos beneficiosos, por ejemplo como mensajeros intracelulares para mantener la homeostasis celular (Dröge, 2003). Para esto, los organismos poseen toda una maquinaria enzimática y no enzimática para regular los niveles de estos compuestos. Cuando por alguna razón (endógena o exógena), se produce un desbalance entre especies prooxidantes y antioxidantes, se genera un fenómeno denominado estrés oxidativo (EO, Davies, 1995).

Este desbalance con exceso de especies prooxidantes puede generar daño oxidativo a las diferentes biomoléculas, con consecuencias relevantes para la

fisiología de los organismos. Es así como, por ejemplo, en la literatura existe evidencia de este tipo de daño en lípidos, tanto en humanos como en invertebrados, vertebrados y plantas (Banerjee *et al.*, 1999; Barata *et al.*, 2005; Oruc *et al.*, 2000; Shi *et al.*, 2006). La peroxidación lipídica puede producir disrupción de las membranas celulares, causando disfunción en su permeabilidad y a una mayor escala necrosis en los tejidos (Bayoumi *et al.*, 2001). Por otro lado, también se ha informado oxidación de proteínas en distintos organismos como efectos de la exposición a contaminantes (Braconi *et al.*, 2011). La oxidación de proteínas en humanos ha sido relacionada con el envejecimiento celular y enfermedades como la arteriosclerosis (Valavanidis *et al.*, 2006). El daño oxidativo a los ácidos nucleicos (particularmente ADN) también ha sido foco de atención, tanto en estudios de salud humana como de efectos de contaminantes sobre otros organismos (Collins, 2009; Guilherme *et al.*, 2012). La oxidación del ADN puede producir mutagénesis y esto desencadenar un proceso de carcinogénesis (Azqueta *et al.*, 2009).

#### **1.10. Biomarcadores de estrés oxidativo.**

El equilibrio entre los factores endógenos y exógenos prooxidantes (por ejemplo, contaminantes ambientales) y las defensas antioxidantes (enzimáticas y no enzimáticas) en sistemas biológicos pueden usarse para evaluar los efectos tóxicos en condiciones ambientales estresantes, especialmente el daño oxidativo inducido por diferentes clases de contaminantes químicos. El papel de estos sistemas antioxidantes y su sensibilidad pueden ser de gran importancia en estudios de toxicología ambiental (Valavanidis *et al.*, 2006).

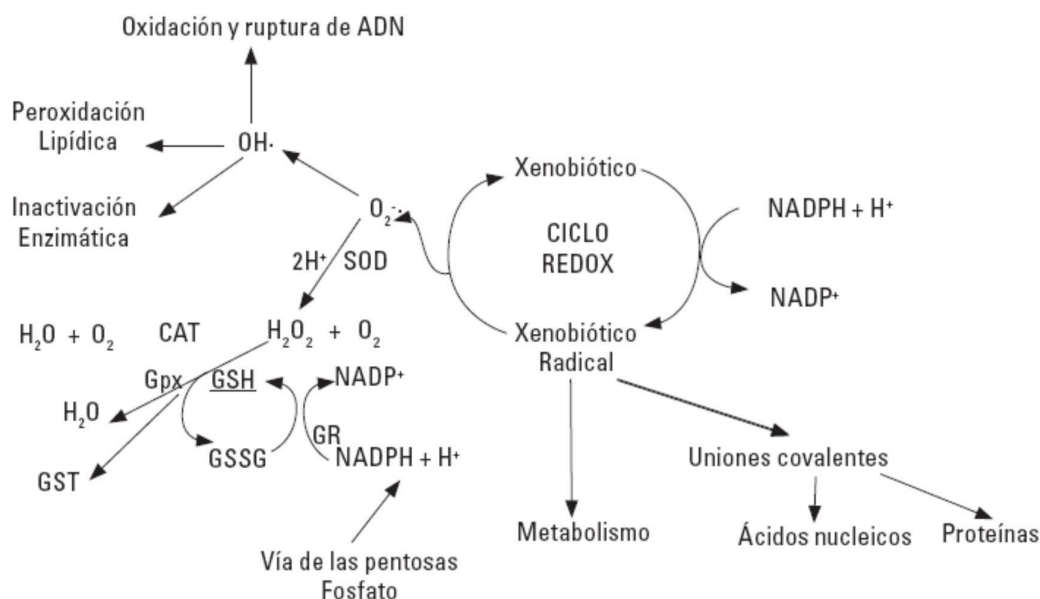
Dentro de los biomarcadores no enzimáticos se encuentran el tripéptido glutatión (GSH), la vitamina E, el ascorbato, el  $\beta$ -caroteno y el urato (Valavanidis *et al.*, 2006). Cuando un radical reacciona con el GSH, se forma un nuevo radical  $\text{GSH}\cdot$ , que se

estabiliza formando un enlace disulfuro con otro GSH·, dando como resultado glutatión disulfuro (GSSG). Los niveles de GSH se recuperan por la acción de la enzima glutatión reductasa (GR, Lesser, 2006).

Por otro lado, dentro de los sistemas enzimáticos que actúan contra el estrés oxidativo se encuentra la enzima superóxido dismutasa (SOD). Esta enzima convierte  $O_2^{\cdot-}$  a  $H_2O_2$ , y es la primera defensa contra los radicales libres derivados del oxígeno. Puede ser inducida rápidamente si la célula u organismo son expuestos a un estrés oxidativo (Michiels *et al.*, 1994). La catalasa (CAT) es una enzima con actividad peroxidasa que contiene un grupo hemo y cataliza la conversión de  $H_2O_2$  en  $H_2O$  y  $O_2$ . Esta enzima es un tetrámero, y tiene alta afinidad por el  $H_2O_2$ , lo que la hace más eficiente en la eliminación de altas concentraciones de  $H_2O_2$  (Lesser, 2006). Existen otras enzimas con esta misma actividad peroxidasa, como la guaiacol peroxidasa (POD), glutatión peroxidasa (GPx) y la ascorbato peroxidasa (APx).

Las glutatión s- transferasas (GST) conforman una familia multigénica de isoenzimas que catalizan la conjugación de compuestos hidrofílicos al GSH. Las mismas participan en la defensa contra el estrés oxidativo ya que son capaces de detoxificar compuestos endógenos peligrosos producto de la descomposición tanto de peróxidos lipídicos o hidroperóxidos de ADN. Sumado a esta función, existen al menos dos clases de GST que tienen actividad peroxidasa, capaz de reducir  $H_2O_2$  (Cnubben *et al.*, 2001).

En la Figura 9 se esquematizan las relaciones entre oxidantes y antioxidantes.



**Figura 9. Ciclo redox.** Sitio de acción de las principales defensas antioxidantes enzimáticas y principales consecuencias toxicológicas del ataque de los radicales libres. (Fuente: Basada en Di Giulio y Hintion, 2008; modificada por Ochoa y González, 2008).

Como se mencionó anteriormente, las ERO pueden dañar las membranas lipídicas, generándose la oxidación de los ácidos grasos, proceso que culmina con un producto final denominado malondialdehído (MDA). La cuantificación de este aldehído tóxico se utiliza para detectar dicho proceso y se realiza mediante la reacción con el ácido 2- tiobarbitúrico (TBA), que da nombre a la técnica TBARS (por el inglés "thiobarbituric acid reactive species", Oakes y van der Kraak, 2003)

En moléculas proteicas pueden observarse diferentes formas de daño, incluyendo tiolación, metilación y carbonilación. En particular, la carbonilación es irreversible y puede llevar a la degradación enzimática de dichas moléculas proteicas (Carney Almroth *et al.*, 2008). Es así como la cuantificación de grupos carbonilo (GC) puede convertirse en una técnica conveniente para detectar y cuantificar la modificación oxidativa de proteínas durante el estrés oxidativo (Parvez y Raissudin, 2005).

### 1.11. Biomarcadores de daño al ADN

El estudio del daño al ADN a nivel cromosómico es una parte esencial de la genética toxicológica debido a la importancia que tienen las mutaciones en eventos de carcinogénesis y otros efectos como problemas reproductivos. El ensayo de micronúcleos (MN) es uno de los métodos más elegidos para ensayar daño cromosómico, ya que permite identificar con certeza tanto pérdida de cromosomas como ruptura de los mismos (Fenech, 2000). Un MN es un núcleo supernumerario visible por microscopía óptica en el citoplasma de la célula (Carrasco *et al.*, 1990), formado por un cromosoma o fragmento del mismo envuelto en una membrana nuclear. Si se trata de un fragmento de cromosoma, el mismo es producto de un proceso de ruptura de la doble hebra de ADN (clastogénesis), en tanto que si se trata de cromosomas enteros, muy probablemente indica problemas en el huso acromático que impidieron la normal migración del cromosoma. En la figura 10 se esquematiza la formación de MN.

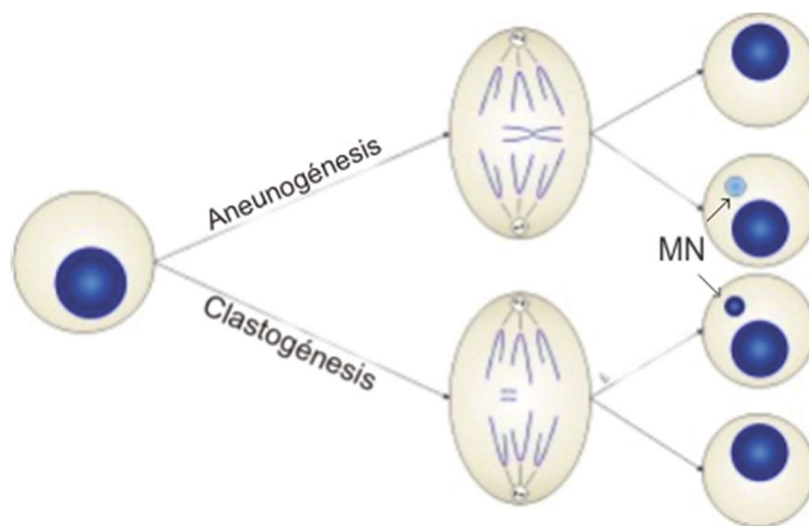


Figura 10: Esquema de los posibles procesos generadores de micronúcleos (MN).

Más recientemente se estableció la utilización de la electroforesis en gel de células aisladas, mejor conocida como ensayo cometa (EC), desarrollada originalmente por Singh *et al.* (1988). Esta técnica con sus modificaciones posteriores, ha sido

ampliamente adoptada para la evaluación del daño al ADN tanto en humanos (Benedetti *et al.*, 2013) como en otros mamíferos (Grisolia, 2002), reptiles (Poletta *et al.*, 2009), anfibios (Feng *et al.*, 2004), peces (Simoniello *et al.*, 2009) y plantas (Gichner *et al.*, 2004) entre otros organismos. Una de las modificaciones incorporadas al EC fue la utilización de endonucleasas específicas para detectar la oxidación tanto de purinas (FPG) como de pirimidinas (ENDO III, Collins *et al.*, 1993). Es así como el EC no sólo representa una herramienta útil y altamente sensible para la cuantificación del daño al ADN (Ramsdorf *et al.*, 2009), sino que nos puede brindar información acerca de la naturaleza del daño, en este caso, si se trata de daño oxidativo. La utilización de endonucleasas en el EC, sustituyó en gran medida a la medición directa de las bases oxidadas, principalmente 8-oxo-7,8-dihidro- 2'-desoxiguanosina (8- oxodGua). Esto se debió, principalmente, al proceso de oxidación que podía surgir en la preparación de las muestras para la cromatografía gaseosa, técnica utilizada para la cuantificación 8- oxodGua (Azqueta *et al.*, 2009).



### 1.12. Hipótesis planteadas para la investigación.

1- El imidacloprid inhibe el crecimiento de *M. quitense* y afecta la fotosíntesis disminuyendo las concentraciones de clorofilas A y B.

2. El imidacloprid genera estrés y daño oxidativo en *M. quitense*.

3- El imidacloprid es incorporado por *A. facetus* siendo mayor la concentración en los tejidos a mayor tiempo de exposición y a mayor concentración de imidacloprid en el medio.

4- El imidacloprid genera estrés y daño oxidativo en *A. facetus*.

5- El imidacloprid genera daño genético en *A. facetus*, siendo uno de los mecanismos el daño oxidativo a las bases de ADN.

### 1.13. Objetivos planteados para la investigación.

1. Determinar los efectos de imidacloprid en el crecimiento y las concentraciones de pigmentos fotosintéticos de *M. quitense*.

2. Analizar la distribución del imidacloprid en los diferentes tejidos de *A. facetus*.

3. Estudiar biomarcadores de estrés oxidativo: a) enzimáticos de exposición como la actividad de catalasa (CAT), glutatión reductasa (GR), glutatión-S-transferasa (GST), Guaiacol Peroxidasa (POD) y Superóxido Dismutasa (SOD) y las concentraciones de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y b) de daño como los productos de oxidación lipídica y proteica (MDA y grupos carbonilo, respectivamente) realizando curvas de concentración- y tiempo- respuesta en el pez dulceacuícola *A. facetus* y en la macrófita acuática *M. quitense*.

4. Cuantificar biomarcadores de daño genético como la frecuencia de micronúcleos, la fragmentación del ADN y la oxidación de bases del ADN en *A. facetus*.

5. Comparar la sensibilidad de estos biomarcadores en la detección de la contaminación agrícola, de manera de seleccionar aquellos más sensibles en la especie más óptima, a ser usada en futuros estudios de biomonitoreo de zonas sujetas a contaminación por imidacloprid.

## Bibliografía:

- AgBioWorld Foundation. (consultado Junio 2017). Disponible en: <http://www.agbioworld.org/biotech-info/topics/borlaug/green-revolution.html>
- Alaux C, Brunet JL, Dussaubat C, Mondet F, Tchamitchan S, Cousin M, ... y Le Conte Y. 2010. Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology*, 12(3), 774– 782.
- Anderson JC, Dubetz C y Palace VP. 2015. Neonicotinoids in the Canadian aquatic environment: A literature review on current use products with a focus on fate, exposure, and biological effects. *Science of the Total Environment*, 505, 409– 422.
- Ansoar-Rodriguez Y, Christofolletti CA, Pedro J, Bueno OC, Malaspina O, Ferreira RAC y Fontanetti CS. 2015. *Allium cepa* and *Tradescantia pallida* bioassays to evaluate effects of the insecticide imidacloprid. *Chemosphere*, 120, 438–442.
- Apudo Apudo A, Cao Y, Wakibia J, Li W y Liu F. 2016. Physiological plastic responses to acute NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N toxicity in *Myriophyllum spicatum* L. cultured in high and low nutrient conditions. *Environmental and Experimental Botany*, 130, 79– 85.
- Arancibia F. 2013. Challenging the bioeconomy: The dynamics of collective action in Argentina. *Technology in Society*, 35(2), 79–92.
- Arts G, Davies J, Dobbs M, Ebke P, Hanson M, Hommen U, ... y Poulsen V. 2010. AMEG: The new SETAC advisory group on aquatic macrophyte ecotoxicology. *Environmental Science and Pollution Research*, 17(4), 820– 823.
- Atucha AJ, Lacaze MV y Gualdoni P. 2012. El Producto Bruto del Sector Primario como indicador de actividad económica en el Partido de General Pueyrredon. *Visión Rural*, 29(95), 50-56.
- Azqueta A, Shaposhnikov S y Collins AR. 2009. DNA oxidation: Investigating its key role in environmental mutagenesis with the comet assay. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 674 (1–2), 101– 108.
- Bacandritsos N, Granato A, Budge G, Papanastasiou I, Roinioti E, Caldon M, ... y Mutinelli F. 2010. Sudden deaths and colony population decline in Greek honey bee colonies. *Journal of Invertebrate Pathology*, 105(3), 335– 340.
- Banerjee BD, Seth V, Bhattacharya A, Pasha ST y Chakraborty AK. 1999. Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers. *Toxicology Letters*, 107 (1–3), 33– 47.
- Barata C, Varo I, Navarro JC, Arun S y Porte C. 2005. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 140 (2), 175–186.
- Bayoumi AE, García-Fernández AJ, Ordóñez C, Pérez-Pertejo Y, Cubría JC, Reguera RM., ... y Ordóñez D. 2001. Cyclodiene organochlorine insecticide-induced alterations in the sulfur-redox cycle in CHO-K1 cells. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 130 (3), 315–323.
- Benedetti D, Nunes E, Sarmento M, Porto C, Santos CEI, Dos Dias JF y Da Silva J. 2013. Genetic damage in soybean workers exposed to pesticides: Evaluation with the comet and buccal micronucleus cytome assays. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental*

*Mutagenesis*, 752(1–2), 28–33.

- Bianchi J, Casimiro Fernandes TC y Marin-Morales MA. 2016. Induction of mitotic and chromosomal abnormalities on *Allium cepa* cells by pesticides imidacloprid and sulfentrazone and the mixture of them. *Chemosphere*, 144, 475– 483.
- Blacquière T y van der Steen JJ. 2017. Three years of banning neonicotinoid insecticides based on sub-lethal effects: can we expect to see effects on bees? *Pest Management Science*. Manuscrito aceptado.
- Bonmatin JM, Giorio C, Girolami V, Goulson D, Kreutzweiser DP, Krupke C, ... y Tapparo A. 2015. Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(1), 35–67.
- Brack W, Dulio V, Agerstrand M, Allan I, Altenburger R, Brinkmann M y Vrana B. 2017. Towards the review of the European Union Water Framework management of chemical contamination in European surface water resources. *Science of the Total Environment*, 576, 720–737.
- Braconi D, Bernardini G y Santucci A. 2011. Linking protein oxidation to environmental pollutants: Redox proteomic approaches. *Journal of Proteomics*, 74 (11), 2324– 2337.
- Brooks BW, Fulton BA y Hanson ML. 2015. Aquatic toxicology studies with macrophytes and algae should balance experimental pragmatism with environmental realism. *Science of the Total Environment*, 536 (July), 406–7.
- Bulus Rossini GD y Ronco AE. 2004. Sensitivity of *Cichlasoma facetum* (Cichlidae, Pisces) to metals. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 72(4), 763–768.
- Bunzel K, Liess M y Kattwinkel M. 2014. Landscape parameters driving aquatic pesticide exposure and effects. *Environmental Pollution*, 186, 90–97.
- Cabrita E, Ma S, Diogo P, Martínez-Páramo S, Sarasquete C y Dinis MT. 2011. The influence of certain aminoacids and vitamins on post-thaw fish sperm motility, viability and DNA fragmentation. *Animal Reproduction Science*, 125(1–4), 189–195.
- Carney Almroth B, Albertsson E, Sturve J y Förlin L. 2008. Oxidative stress, evident in antioxidant defences and damage products, in rainbow trout caged outside a sewage treatment plant. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 70(3), 370–378.
- Carrasco KR, Tilbury KL y Myers MS. 1990. Assessment of the Piscine Micronucleus Test as an in situ Biological indicator of Chemical Contaminant Effects. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 47(11), 2123–2136.
- Cedergreen N y Streibig JC. 2005. The toxicity of herbicides to non-target aquatic plants and algae: Assessment of predictive factors and hazard. *Pest Management Science*, 61 (12), 1152–1160.
- Ceska O, Ceska A y Warrington PD. 1986. *Myriophyllum quitense* and *Myriophyllum ussuriense* (Haloragaceae) in British Columbia, Canada. *Brittonia*, 38 (1), 73–81.
- Cnubben NHP, Rietjens IMCM, Wortelboer H, Van Zanden J y Van Bladeren PJ. 2001. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 10(4), 141–152.
- Coats JR, Symonik DM, Bradbury SP, Dyer SD, Timson LK y Atchison GJ. 1989. Toxicology of synthetic pyrethroids in aquatic organisms: An overview. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 8(8), 671–679.
- Collins AR. 2009. Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay.

*Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 681 (1), 24–32.

- Collins AR, Duthie SJ y Dobson VL. 1993. Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis*, 14(9), 1733–1735.
- Commission Implementing Regulation (EU) No 485/2013. 2013. *Official Journal of the European Union*, 139, 12–26.
- Connell DW. 2005. CRC Press. Taylor & Francis Group. Boca Raton, FL, USA. 468 pp.
- Couch R y Nelson E. 1988. *Myriophyllum quitense* (Haloragaceae) in the United States. *Brittonia*, 40 (1), 85– 88.
- Crupkin AC y Menone ML. 2013. Changes in the activities of glutathione-S-transferases, glutathione reductase and catalase after exposure to different concentrations of cadmium in *Australoheros facetus* (Cichlidae, Pisces). *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, 8(1), 21–25.
- Crupkin AC, Carriquiriborde P, Mendieta J, Panzeri AM, Ballesteros ML, Miglioranza KSB, Menone y ML. 2013. Oxidative stress and genotoxicity in the South American cichlid, *Australoheros facetus*, after short-term sublethal exposure to endosulfan. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 105(2), 102–110.
- Davies KJ. 2000. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life*, 50 (4–5), 279–89.
- Davies KJ. 1995. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochemical Society Symposium*, 61, 1– 31.
- De Gerónimo E, Aparicio VC, Bárbaro S, Portocarrero R, Jaime S y Costa JL. 2014. Presence of pesticides in surface water from four sub-basins in Argentina. *Chemosphere*, 107, 423 – 431.
- Delvenne P, Vasen F y Vara AM. 2013. The “soy-ization” of Argentina: He dynamics of the “globalized” privatization regime in a peripheral context. *Technology in Society*, 35(2), 153–162.
- den Besten PJ y Munawar M. 2005. *Ecotoxicological Testing of Marine and Freshwater Ecosystems: emerging techniques, trends, and strategies*. CRC Press Taylor & Francis Group. Boca Raton, FL, USA. 271 pp.
- Di Giulio RT y Hinton DE. 2008. *The toxicology of fishes*. CRC Press Taylor & Francis Group. Boca Raton, FL, USA. 1071 pp.
- Dröge W. 2003. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiology Reviews*, 82: 47– 95.
- European Food Safety Authority. 2013. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance imidacloprid. *EFSA Journal* 11, 3068.
- Elbert A, Haas M, Springer B, Thielert W y Nauen R. 2008. Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection. *Pest Management Science* 64, 1099- 1105.
- Ensminger MP, Budd R, Kelley KC y Goh KS. 2013. Pesticide occurrence and aquatic benchmark exceedances in urban surface waters and sediments in three urban areas of California, USA, 2008-2011. *Environmental Monitoring and Assessment*, 185(5), 3697–3710.
- Feldberg E y Bertollo LAC. 1985. Nucleolar Organizing Regions in Some Species of Neotropical Cichlid Fish (Pisces, Perciformes). *Caryologia*, 38(3-4), 319–324.
- Fenech M. 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 455 (1–2), 81–95.
- Feng S, Kong Z, Wang X, Zhao L y Peng P. 2004. Acute toxicity and genotoxicity of two novel pesticides on amphibian, *Rana N. Hallowell*. *Chemosphere*, 56(5), 457–463.

- Fernald ML. 1919. Two new *myriophyllums* and a species new to the United States. *Rhodora* 21, 120- 124.
- Fernández EM, Ferriz RA, Bentos CA y López GRB. 2012. Dieta y ecomorfología de la ictiofauna del arroyo Manantiales, provincia de Buenos Aires, Argentina. *Revista Del Museo Argentino de Ciencias Naturales, Nueva Serie*, 14(1), 1–13.
- Ford KA y Casida JE. 2008. Comparative metabolism and pharmacokinetics of seven neonicotinoid insecticides in spinach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(21), 10168–10175.
- Ford KA y Casida JE. 2006. Chloropyridinyl neonicotinoid insecticides: Diverse molecular substituents contribute to facile metabolism in mice. *Chemical Research in Toxicology*, 19(7), 944–951.
- Fossen M. 2006. Environmental fate of imidacloprid. *California Department of Pesticide Regulation*, 1-16.
- Garanzini DS y Menone ML. 2015. Azoxystrobin Causes Oxidative Stress and DNA Damage in the Aquatic Macrophyte *Myriophyllum quitense*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 94 (2), 146–151.
- Gibbons D, Morrissey C y Mineau P. 2015. A review of the direct and indirect effects of neonicotinoids and fipronil on vertebrate wildlife. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(1), 103–118.
- Gichner T, Patková Z, Száková J y Demnerová K. 2004. Cadmium induces DNA damage in tobacco roots, but no DNA damage, somatic mutations or homologous recombination in tobacco leaves. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 559(1–2), 49–57.
- Gómez SE, Gonzalez Naya J y Giusto A. 2003. Velocidad de natación de un especialista en maniobra, *Cichlasoma facetum* (Jenyns) (Pisces, Cichlidae) en condiciones experimentales. *Revista del Museo Argentino Ciencias Naturales* 5 (1), 87– 92.
- Gómez SE y Gonzalez Naya MJG. 2007. Resistencia a la salinidad en dos especies de peces neotropicales de la familia Cichlidae (Pisces, Perciformes). *Memoria de La Fundación La Salle de Ciencias Naturales* 166, 47–57.
- Gonzalez Naya MJ, Tombari A, Volpedo A y Gómez SE. 2012. Size related changes in sagitta otoliths of *Australoheros facetus* (Pisces; Cichlidae) from South America. *Journal of Applied Ichthyology* 28(5), 752–755.
- Goulson D. 2014. Pesticides linked to bird declines. *Nature*, 511, 295–296.
- Grisolia CK. 2002. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 518(2), 145–150.
- Gross EM, Meyer H y Schilling G. 1996. Release and ecological impact of algicidal hydrolysable polyphenols in *Myriophyllum spicatum*. *Phytochemistry*, 41(1), 133– 138.
- Guilherme S, Santos MA, Barroso C, Gaivão I y Pacheco M. 2012. Differential genotoxicity of Roundup® formulation and its constituents in blood cells of fish (*Anguilla anguilla*): Considerations on chemical interactions and DNA damaging mechanisms. *Ecotoxicology*, 21(5), 1381–1390.
- Gutierrez M, Bistoni MDLA y Haro JG. 1986. Hábitos alimentarios de *Cichlasoma facetum* (Jenyns) (Pisces, Cichlidae) en el Río Primero (Córdoba, Argentina). *Revista de La Asociación de Ciencias Naturales Del Litoral* 17(1), 115– 126.
- Hallmann CA, Foppen RPB, van Turnhout CAM, de Kroon H y Jongejans E. 2014. Declines in

- insectivorous birds are associated with high neonicotinoid concentrations. *Nature*, 511 (7509), 341–343.
- Hartz SM, Peret AC y Barbieri G. 1999. Reproduction of *Gymnogeophagus lacustris*, a cichlid endemic to southern Brazil. *Ichthyology Exploration Freshwaters*, 10, 247–253.
  - Hunt L, Bonetto C, Resh VH, Forsin D, Fanelli S, Marrochi N y Lydy MJ. 2016. Insecticide concentrations in stream sediments of soy production regions of South America. *Science of the Total Environment*, 547, 114–124.
  - Hussain S, Hartley CJ, Shettigar M y Pandey G. 2016. Bacterial biodegradation of neonicotinoid pesticides in soil and water systems. *FEMS Microbiology Letters*, 363 (23), 1–13.
  - International Union of Pure and Applied Chemistry. PPDB: Pesticides Properties DataBase. University of Hertfordshire, Hatfield, Hertfordshire, UK. (consultado Mayo 2017). Disponible en: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/atoz.htm>
  - Jemec A, Tišler T, Drobne D, Sepčić K, Fournier D y Trebše P. 2007. Comparative toxicity of imidacloprid, of its commercial liquid formulation and of diazinon to a non-target arthropod, the microcrustacean *Daphnia magna*. *Chemosphere*, 68 (8), 1408–1418.
  - Jergentz S, Mugni H, Bonetto C y Schulz R. 2005. Assessment of insecticide contamination in runoff and stream water of small agricultural streams in the main soybean area of Argentina. *Chemosphere*, 61(6), 817–826.
  - Jeschke P y Nauen R. 2008. Neonicotinoids— from zero to hero in insecticide chemistry. *Pest management science*, 64(11), 1084–1098.
  - Jeschke P, Nauen R, Schindler M y Elbert A. 2011. Overview of the Status and Global Strategy for Neonicotinoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 2897–2908.
  - Keskinkan O, Goksu MZL, Yuceer A, Basibuyuk M y Forster CF. 2003. Heavy metal adsorption characteristics of a submerged aquatic plant (*Myriophyllum spicatum*). *Process Biochemistry*, 39 (2), 179–183.
  - Krayem M, Baydoun M, Deluchat V, Lenain JF, Kazpard V y Labrousse P. 2016. Absorption and translocation of copper and arsenic in an aquatic macrophyte *Myriophyllum alterniflorum* DC in oligotrophic and eutrophic conditions. *Environmental Science and Pollution Research*, 23 (11), 11129–11136.
  - Kreuger J, Graaf S, Patring J y Adielsson S. 2010. Pesticides in surface water in areas with open ground and greenhouse horticultural crops in Sweden 2008. *Swedish University of Agricultural Sciences*, 49 pp.
  - Lamers M, Anyusheva M, La N, Nguyen VV y Streck T. 2011. Pesticide Pollution in Surface- and Groundwater by Paddy Rice Cultivation: A Case Study from Northern Vietnam. *CLEAN - Soil, Air, Water*, 39 (4), 356–361.
  - Leguizamón A. 2014. Modifying Argentina: GM soy and socio-environmental change. *Geoforum*, 53, 149–160.
  - Lesser MP. 2006. Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. *Annual Review of Physiology*, 68 (3), 253–278.
  - Lewis MA. 1995. Use of freshwater plants for phytotoxicity testing: A review. *Environmental Pollution*, 87 (3), 319–336.
  - Liess M, Foit K, Knillmann S, Schäfer RB y Liess HD. 2016. Predicting the synergy of multiple stress



effects. *Scientific Reports*, 6, 1- 9.

- López HL, Miquelarena AM y Menni RC. 2003. Lista comentada de los peces continentales de la Argentina. ProBiota, *Serie Técnica y Didáctica* N° 5, FCNYM-UNLP.

- Lytle JS y Lytle TF. 2001. Use of plants for toxicity assessment of estuarine ecosystems. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20(1), 68-83.

- Main AR, Michel NL, Cavallaro MC, Headley JV, Peru KM y Morrissey CA. 2016. Snowmelt transport of neonicotinoid insecticides to Canadian Prairie wetlands. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 215, 76–84.

- Main AR, Headley JV, Peru KM, Michel NL, Cessna AJ y Morrissey CA. 2014. Widespread use and frequent detection of neonicotinoid insecticides in wetlands of Canada's prairie pothole region. *PLoS ONE*, 9(3), e92821.

- Malev O, Klobucar RS, Fabbretti E y Trebse P. 2012. Comparative toxicity of imidacloprid and its transformation product 6-chloronicotinic acid to non-target aquatic organisms: Microalgae *Desmodesmus subspicatus* and amphipod *Gammarus fossarum*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 104(3), 178–186.

- Martínez-Álvarez RM, Morales AE y Sanz A. 2005. Antioxidant defenses in fish: Biotic and abiotic factors. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 15, 75–88.

- McAlpine DF, Bishop G, Ceska O, Moody ML y Ceska A. 2007. Andean watermilfoil, *Myriophyllum quitense* (Haloragaceae), in the Saint John River estuary system, New Brunswick, Canada. *Rhodora*, 109 (937), 101–107.

- McCarty LS y Munkittrick KR. 1996. Environmental biomarkers in aquatic toxicology: Fiction, fantasy, or functional? *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 2 (2), 268–274.

- Meerhoff M, Mazzeo N, Moss B y Rodríguez-Gallego L. 2003. The structuring role of free-floating versus submerged plants in a subtropical shallow lake. *Aquatic Ecology*, 37(4), 377–391.

- Menni RC. 2004. Peces y ambientes en la Argentina continental (No. 5). *Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia"*.

- Menone ML, Pérez DJ, Lukaszewicz G y Camadro EL. 2015. Identificación de hidrófitas dulceacuícolas para estudios de genotoxicidad de contaminantes acuáticos. *Journal of Basic and Applied Genetics*, 2 (1), 5– 13.

- Michiels C, Raes M, Toussaint O y Remacle J. 1994. Importance of se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 17(3), 235–248.

- Miles JC, Hua J, Sepulveda MS, Krupke CH y Hoverman T. 2017. Effects of clothianidin on aquatic communities: Evaluating the impacts of lethal and sublethal exposure to neonicotinoids, 1–24. *Plos One* 12(3): e0174171.

- Ministerio de Agroindustria, Presidencia de la Nación. 2017. Portal de Datos Abiertos. (consultado Mayo 2017). Disponible en: <https://datos.magyp.gob.ar/>

- Moore MT, Locke MA y Kröger R. 2016. Using aquatic vegetation to remediate nitrate, ammonium, and soluble reactive phosphorus in simulated runoff. *Chemosphere*, 160, 149–154.

- Morrissey CA, Mineau P, Devries JH, Sanchez-Bayo F, Liess M, Cavallaro MC y Liber K. 2015. Neonicotinoid contamination of global surface waters and associated risk to aquatic invertebrates: A review. *Environment International*, 74, 291–303.



- Moza PN, Hustert K, Feicht E y Kettrup A. 1998. Photolysis of imidacloprid in aqueous solution. *Chemosphere*, 36(3), 497–502.
- Natalia T y Robert M. 2016. Journal of Fertilizers & Pesticides Life-Cycle Assessment of Neonicotinoid Pesticides. *Journal of Fertilizers and Pesticides*, 7(1), 1–8.
- Navalón A, González-Casado A, El-Khattabi R, Vilchez JL y Fernández-Alba AR. 1997. Determination of Imidacloprid in vegetable samples by gas chromatography- mass spectrometry. *Analyst* 122, 579- 581.
- Nelson JS, Grande TC y Wilson MV. 2016. *Fishes of the World*. John Wiley & Sons. Hoboken, New Jersey, USA. 752 pp.
- Ngayila N, Botineau M, Baudu M y Basly JP. 2009. *Myriophyllum alterniflorum* DC. Effect of low concentrations of copper and cadmium on somatic and photosynthetic endpoints: A chemometric approach. *Ecological Indicators*, 9 (2), 307– 312.
- Nichols SA y Shaw BH. 1986. Ecological life histories of the three aquatic nuisance plants, *Myriophyllum spicatum*, *Potamogeton crispus* and *Elodea canadensis*. *Hydrobiologia*, 131 (1), 3– 21.
- Nimptsch J, Wunderlin DA, Dollan A y Pflugmacher S. 2005. Antioxidant and biotransformation enzymes in *Myriophyllum quitense* as biomarkers of heavy metal exposure and eutrophication in Suquia River basin (Córdoba, Argentina). *Chemosphere*, 61 (2), 147–157.
- Noguez Piedras SR, Ruas Oliveira JL, Rocha Moraes PR y Bager A. 2006. Toxicidade aguda da amônia não ionizada e do nitrito em alevinos de *Cichlasoma facetum* (Jenyns, 1842). *Ciência e Agrotecnologia*, 30(5), 1008–1012.
- Nollet LML y Rathore HS. 2009. *Handbook of Pesticides: Methods of Pesticide Residues Analysis*. CRC Press. Taylor & Francis Group. Boca Raton, FL, USA. 628 pp.
- NRC (National Research Council). 1987. Committee on biological markers. *Environment and Health Perspectives*, 74, 3-9.
- Nuttens A, Chatellier S, Devin S, Guignard C, Lenouvel A y Gross EM. 2016. Does nitrate co-pollution affect biological responses of an aquatic plant to two common herbicides? *Aquatic Toxicology*, 177, 355–364.
- Nyman AM, Hintermeister A, Schirmer K y Ashauer R. 2013. The Insecticide Imidacloprid Causes Mortality of the Freshwater Amphipod *Gammarus pulex* by Interfering with Feeding Behavior. *PLoS ONE*, 8(5).
- Oakes KD y Van Der Kraak GJ. 2003. Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. *Aquatic Toxicology*, 63(4), 447–463.
- Ochoa DM y González JF. 2008. Estrés oxidativo en peces inducido por contaminantes ambientales. *Revista de Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 55, 115-126.
- OECD. 2014. OECD guidelines for the testing of chemicals: TG 238, sediment- free *Myriophyllum spicatum* toxicity test. (consultado Junio 2017). Disponible en: <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/>
- Oldroyd BP. 2007. What's killing American honey bees? *PLoS Biology*, 5(6), 1195– 1199.
- Orchard AE. 1981. A revision of South American *Myriophyllum* (Haloragaceae), and its repercussions on some Australian and North American species. *Brunonia*, 4: 27-65.

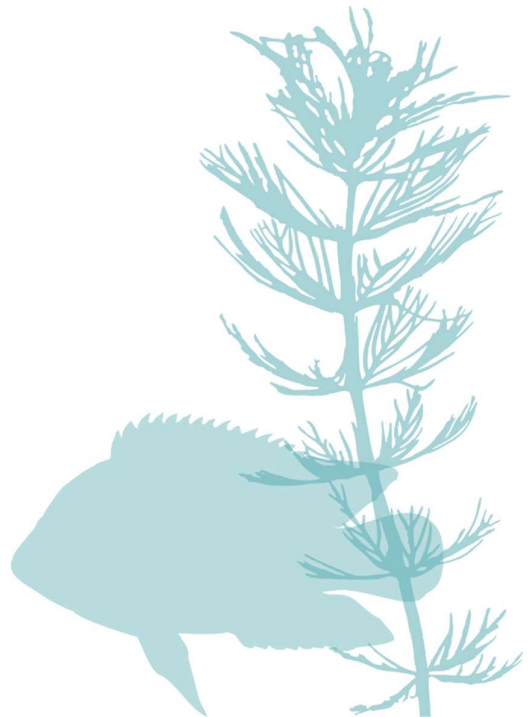
- OPDS. 2013. Plaguicidas en el territorio bonaerense: información toxicológica, ecotoxicológica y comportamiento ambiental. *Organismo Provincial para el Desarrollo Sustentable*. Buenos Aires, 136 pp.
- Oruc EO y Üner N. 2000. Combined effects of 2,4-D and azinphosmethyl on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in liver of *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology*, 127 (3), 291–296.
- Parvez S y Raisuddin S. 2005. Protein carbonyls: Novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 20(1), 112–117.
- Peakall D. 1992. Animal Biomarkers as Pollution Indicators. Chapman & Hall Ecotoxicology Series, London, UK, 311 pp.
- Pengue WA. 2009. Agrofuels and Agrifoods: Counting the Externalities at the Major Crossroads of the 21st Century. *Bulletin of Science, Technology & Society*, 29(3), 167–179.
- Pengue WA. 2014. Cambios y escenarios en la agricultura argentina del siglo XXI. *Panel de Recursos UNEP*.
- Perazzo G, Noleto RB, Vicari MR, Machado PC, Gava A y Cestari MM. 2011. Chromosomal studies in *Crenicichla lepidota* and *Australoheros facetus* (Cichlidae, Perciformes) from extreme Southern Brazil. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 21(3), 509–515.
- Perez DJ, Okada E, De Gerónimo E, Menone ML, Aparicio VC y Costa JL. 2017. Spatial and temporal trend and flow dynamics of glyphosate and other pesticides within an agricultural watershed in Argentina. *Environmental Toxicology and Chemistry*. En Prensa. doi: 10.1002/etc.3897.
- Perú SI, Pereira L y Quintero Blanco SA. 2003. Biomarcadores en *Cichlasoma facetum* (Jenyns, 1842) expuestos a efluentes de papeleras de arroyos periurbanos. *Biología acuática* 20, 80-83.
- Pestana JLT, Alexander AC, Culp JM, Baird DJ, Cessna AJ y Soares AMVM. 2009. Structural and functional responses of benthic invertebrates to imidacloprid in outdoor stream mesocosms. *Environmental Pollution*, 157(8–9), 2328–2334.
- Phillips PJ y Bode RW. 2004. Pesticides in surface water runoff in south-eastern New York State, USA: Seasonal and stormflow effects on concentrations. *Pest Management Science*, 60(6), 531–543.
- Poletta GL, Larriera A, Kleinsorge E y Mudry MD. 2009. Genotoxicity of the herbicide Roundup (glyphosate) in broad-snouted caimán (*Caiman latirostris*) evidenced by the Comet assay and the Micronucleus test. *Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 672, 95-102.
- Ramsdorf WA, Guimarães FDSF, Ferraro MVM, Gabardo J, Trindade EDS y Cestari MM. 2009. Establishment of experimental conditions for preserving samples of fish blood for analysis with both comet assay and flow cytometry. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 673(1), 78–81.
- Rathore HS y Nollet LML. 2012. Pesticides: Evaluation and Environmental Pollution. CRC Press. Taylor & Francis Group. Boca Raton, FL, USA. 659 pp.
- Revenga C, Campbell I, Abell R, de Villiers P y Bryer M. 2005. Prospects for monitoring freshwater ecosystems towards the 2010 targets. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 360(1454), 397–413.
- Ribeiro F, Collares-Pereira MJ y Moyle PB. 2009. Non-native fish in the fresh waters of Portugal,

- Azores and Madeira Islands: A growing threat to aquatic biodiversity. *Fisheries Management and Ecology*, 16(4), 255–264.
- Řičan O y Kullander SO. 2006. Character- and tree-based delimitation of species in the “Cichlasoma” facetum group (Teleostei, Cichlidae) with the description of a new genus. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 44(2), 136–152.
  - Ringuet RA. 1975. Zoogeografía y ecología de los peces de aguas continentales de la Argentina y consideraciones sobre las áreas ictiológicas de América del Sur (Vol. 2). *Ecosur*. 122 pp.
  - Roberts T y Hutson D. 1999. Metabolic Pathways of Agrochemicals, Part 2: Insecticides and Fungicides. The Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Cambridge, UK, 1502 pp.
  - Ronco AE, Carriquiriborde P, Natale GS, Martin ML, Mugni H y Bonetto C. 2008. Integrated Approach for the Assessment of Biotech Soybean Pesticides Impact on Low Order Stream Ecosystems of the Pampasic Region. En: *Ecosystem Ecology Research Trends*. Nova Science Publishers, Capítulo 6. 209- 239 pp.
  - Rouchaud J, Gustin F y Wauters A. 1994. Soil Biodegradation and Leaf Transfer of Insecticide Imidacloprid Applied in Seed Dressing in Sugar Beet Crops. Bull. *Environmental Contamination and Toxicology*, 53, 344-350
  - Ruíz RVH, Moyano GHI y Marchant SMM. 1992. Aspectos biológicos del pez exótico *Cichlasoma facetum* (Jenyns, 1842) (Pisces, Cichlidae) en aguas dulces de Concepción. *Boletín de la Sociedad de Biología*, 63, 193- 201.
  - Sánchez-Bayo F, Goulson D, Pennacchio F, Nazzi F, Goka K y Desneux N. 2016. Are bee diseases linked to pesticides? — A brief review. *Environment International*, 89–90(1), 7–11.
  - Sanchez-Bayo F y Hyne RV. 2014. Detection and analysis of neonicotinoids in river waters - Development of a passive sampler for three commonly used insecticides. *Chemosphere*, 99, 143–151.
  - Schulz R, Bundschuh M, Gergs R, Brühl CA, Diehl D, Entling MH, ... y Schwenk K. 2015. Review on environmental alterations propagating from aquatic to terrestrial ecosystems. *Science of the Total Environment*, 538, 246–261.
  - SENASA. 2017. Registro Nacional de Terapeutica Vegetal. (consultado Mayo de 2017). Disponible en: <http://senasa.gob.ar/informacion/prod-vet-fito-y-fertilizantes/prod-fitosanitarios-y-fertili/registro-nacional-de-terapeutica-vegetal>
  - Shao X, Liu Z, Xu X, Li Z y Qian X. 2013. Overall status of neonicotinoid insecticides in China: Production, application and innovation. *Journal of Pesticide Science*, 38(1), 1–9.
  - Shi Q, Zhu Z, Xu M, Qian Q y Yu J. 2006. Effect of excess manganese on the antioxidant system in *Cucumis sativus* L. under two light intensities. *Environmental and Experimental Botany*, 58 (1–3), 197–205.
  - Simon-Delso N, Amaral-Rogers V, Belzunces LP, Bonmatin JM, Chagnon M, Downs C, ... y Wiemers M. 2015. Systemic insecticides (Neonicotinoids and fipronil): Trends, uses, mode of action and metabolites. *Environmental Science and Pollution Research*, 22 (1), 5–34.
  - Simoniello MF, Gigena F, Poletta G, Loteste A., Kleinsorge E, Campana M, ... y Parma MJ. 2009. Alkaline comet assay for genotoxic effect detection in neotropical fish *Prochilodus lineatus* (Pisces, Curimatidae). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 83(2), 155–158.
  - Singh NP, McCoy MT, Tice RR y Schneider EL. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175(1), 184–191.

- Smith R, Middlebrook R, Turner R, Huggins R, Vardy S y Warne M. 2012. Large-scale pesticide monitoring across Great Barrier Reef catchments - Paddock to Reef Integrated Monitoring, Modelling and Reporting Program. *Marine Pollution Bulletin*, 65(4–9), 117–127.
- Stockholm.Convention. 2008. (consultado Junio 2017). Disponible en <http://chm.pops.int/>
- Starner K y Goh KS. 2012. Detections of the neonicotinoid insecticide imidacloprid in surface waters of three agricultural regions of California, USA, 2010-2011. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 88(3), 316–321.
- Suchail S, Debrauwer L y Belzunces LP. 2004. Metabolism of imidacloprid in *Apis mellifera*. *Pesticide Management Science*, 60(3), 291–296.
- Sur R y Stork A. 2003. Uptake, translocation and metabolism of imidacloprid in plants. *Bulletin of Insectology*, 56(1), 35–40.
- Tennekes HA y Sánchez- Bayo F. 2011. Time-Dependent Toxicity of Neonicotinoids and Other Toxicants: Implications for a New Approach to Risk Assessment. *Environmental & Analytical Toxicology*, (July), 1–8.
- Tilman D. 2001. Forecasting Agriculturally Driven Global Environmental Change. *Science*, 292 (5515), 281–284.
- Tisler T, Jemec A, Mozetic B y Trebse P. 2009. Hazard identification of imidacloprid to aquatic environment. *Chemosphere*, 76, 907-914.
- Tomizawa M y Casida JE. 2003. Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annual Review of Entomology*, 48(1), 339–364.
- Tomizawa M y Casida JE. 2005. Mechanisms of Selective Action. *Annual Reviews in Pharmacology and Toxicology*, 45, 247–68.
- Tomizawa M, Lee DL y Casida JE. 2000. Neonicotinoid insecticides: molecular features conferring selectivity for insect versus mammalian nicotinic receptors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 6016–6024.
- Torres de Lemos C, Rödel PM, Terra NR, D'avila de Oliveira NC y Erdtmann B. 2007. River water genotoxicity evaluation using micronucleus assay in fish erythrocytes. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 66, 391-401.
- USDA, Forrest Service. 2005. Imidacloprid- Human Health and Ecological Risk Assessment- Final Report. 283 pp.
- Valavanidis A; Vlahogianni T; Dassenakis M y Scoullos M. 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 64(2), 178-189.
- van der Oost R, Beyer J y Vermeulen NPE. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13, 57–149.
- Van der Sluijs JP, Simon-Delso N, Goulson D, Maxim L, Bonmatin JM y Belzunces LP. 2013. Neonicotinoids, bee disorders and the sustainability of pollinator services. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 5(3–4), 293– 305.
- Van Dijk TC, Van Staaldin MA y Van der Sluijs JP. 2013. Macro-invertebrate decline in surface water polluted with imidacloprid. *PLoS One*, 8(5), e62374.
- vanEngelsdorp D, Evans JD, Saegerman C, Mullin C, Haubruge E, Nguyen BK, ... y Pettis, JS. 2009. Colony collapse disorder: A descriptive study. *PLoS ONE*, 4(8), e6481.

- vanEngelsdorp D y Meixner MD. 2010. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103 (1), 80-95.
- Vidau C, Diogon M, Aufauvre J, Fontbonne R, Viguès B, Brunet JL, ... y Delbac F. 2011. Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by nosema ceranae. *PLoS ONE*, 6(6), e21550.
- Walker CH. 2008. Organic Pollutants: An Ecotoxicological Perspective, Second Edition. CRC Press. Taylor & Francis Group. Boca Raton, FL, USA. 408 pp.
- Watson GB, Loso MR, Babcock JM, Hasler JM, Letherer TJ, Young CD, ... y Sparks TC. 2011. Novel nicotinic action of the sulfoximine insecticide sulfoxaflor. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41(7), 432–439.
- Yafe A, Loureiro M, Scasso F y Quintans F. 2002. Feeding of two cichlidae species (Perciformes) in a hypertrophic urban lake. *Iheringia. Série Zoologia*, 92(4), 73–79.
- Yamamoto A, Terao T, Hisatomi H, Kawasaki H y Arakawa R. 2012. Evaluation of river pollution of neonicotinoids in Osaka City (Japan) by LC/MS with dopant-assisted photoionisation. *Journal of Environmental Monitoring*, 14(8), 2189- 2194.
- Zabar R, Komel T, Fabjan J, Kralj MB y Trebse P. 2012. Photocatalytic degradation with immobilised TiO<sub>2</sub> of three selected neonicotinoid insecticides: Imidacloprid, thiamethoxam and clothianidin. *Chemosphere*, 89(3), 293–301.
- Zhang Y, Zhang L, Feng L, Mao L y Jiang H. 2017. Oxidative stress of imidaclothiz on earthworm *Eisenia fetida*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 191, 1–6.
- Zheng W y Liu W. 1999. Kinetics and mechanism of the hydrolysis of imidacloprid. *Pesticide Science*, 55, 482–485.

## 2. Materiales y Métodos.



## 2.1. Químicos

Los reactivos utilizados en esta tesis fueron de la mayor pureza disponible adquiridos en Sigma Aldrich, excepto los reactivos glicerol, etanol, metanol y ácido orto-fosfórico que se adquirieron en Merck; el ácido tricloroacético (TCA), cloruro de sodio (NaCl), ácido clorhídrico (HCl), dimetil sulfóxido (DMSO), solución Giemsa, hidróxido de sodio (NaOH) y sales para la solución Hoagland en Biopack, agarosa de punto de fusión normal en General Electric, agarosa de bajo punto de fusión en USB, peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en Riedel de Haën, guajacol y cloruro de potasio (KCl) en Anedra, sodio dodecil sulfato (SDS) en Cicarelli y acetato de etilo en Carlo Erba. El IMI utilizado para realizar los ensayos de esta tesis fue calidad PESTANAL (Sigma Aldrich).

## 2.2. Obtención de especímenes de *A. facetus* y *M. quitense*.

Los especímenes de *A. facetus* se obtuvieron siempre de cuerpos de agua poco antropizados de la región pampásica (37°45'52.0"S 57°27'01.8"W, Figura 11), los cuales se ubicaron alejados de explotaciones agropecuarias. Los peces recolectados se aclimataron por un periodo de al menos dos meses o un tiempo mayor en caso que se requiriera un aumento de la talla hasta el tamaño deseado para realizar los ensayos. La aclimatación de los peces se realizó en la Estación Experimental "J.J. Nágera", perteneciente a la UNMdP. Se utilizaron acuarios de 140 L con agua potable declarada; con un fotoperiodo 12h/12h (luz/oscuridad) y temperatura ambiente, fluctuando en invierno en 10 ± 2 °C y en verano 18 ± 2 °C. Los peces fueron alimentados dos veces al día con alimento granulado comercial Shulet Peishe Trop®. Todos los bioensayos se realizaron en las instalaciones del Departamento de Ciencias Marinas (FCEyN, UNMdP) utilizando agua de red previamente declarada.



La metodología utilizada para la obtención, manipulación, exposición y eutanasia de los peces, para todos los ensayos realizados en la presente tesis, fue aprobada por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL, OCAs 146/15 y 387/17). El descarte líquido de todos los ensayos se realizó según lo normado por el servicio de Seguridad e Higiene de la UNMdP.

Por otra parte, los ejemplares de *M. quitense* empleados para realizar los ensayos se obtuvieron de un reservorio natural perteneciente a la Reserva N° 7 de cría y engorde de ganado de la Estación Experimental Agropecuaria Balcarce (INTA), provincia de Buenos Aires, Argentina (37°45'52.0"S 57°27'01.8"W, Figura 12). Las plantas se aclimataron en peceras conteniendo medio nutritivo Hoagland (Apartado 1 del Apéndice) durante al menos 14 días, con un fotoperiodo controlado de 12h/12h (luz/oscuridad), a temperatura ambiente y 8000 lux acorde a Arts *et al.* (2010).



**Figura 11:** Laguna pampásica típica donde habita *Australoheros facetus* (37°45'52.0"S 57°27'01.8"W).





**Figura 12:** Estanque donde se colectaron los especímenes de *Myriophyllum quitense* (37°47'29.3"S 58°16'28.4"W).

### **2.3. Ensayo para la determinación de la inhibición de crecimiento en *M. quitense*.**

El ensayo de inhibición de crecimiento para *M. quitense* se llevó a cabo a partir de la guía 238 de la OECD para *M. spicatum* (OECD, 2014), con adaptaciones para la especie. Para esto, se realizó un ensayo de exposición a concentraciones crecientes de IMI. Se expusieron plantas de 2,5 cm de longitud (n= 12) durante 14 días a 0 C(-), 10, 100, 1.000, 10.000 y 20.000 µg/ L. La exposición se realizó en cámara de cultivo, con fotoperiodo controlado de 12h/ 12h (luz/oscuridad), pH= 8 y temperatura controlada (20 ± 2 °C). Se colocaron 2 plantas por envase (vidrio) de exposición, y las soluciones de exposición se renovaron a los 7 días, (condiciones semi- estáticas). Al inicio del ensayo, se registraron la longitud total del ejemplar, su peso fresco y el número de verticilos. Se reservaron 6 muestras al inicio del ensayo para la cuantificación de pigmentos fotosintéticos (C(-), T0). A los 3 y 7 días de exposición (T3 y T7) se registraron nuevamente la longitud de las plantas y el número de

verticilos. Al finalizar la exposición (14 días, T14), se registraron la longitud total, el peso fresco y el número de verticilos; y se registró la posible presencia de raíces y ramificaciones. De cada tratamiento, se tomaron 6 submuestras para la cuantificación de pigmentos fotosintéticos. Para la determinación del peso seco se secaron las muestras en estufa a 60 °C hasta peso constante.

#### **2.4. Ensayos para la cuantificación de biomarcadores en *M. quitense*.**

Para la evaluación de biomarcadores en *M. quitense* se desarrollaron 2 (dos) ensayos: uno de concentración- respuesta y otro de tiempo- respuesta. El pH de las soluciones de exposición fue de 6,15- 6,30 en ambos ensayos. El número de plantas por tratamiento fue de 6 (n= 6).

##### **2.4.1. Ensayo concentración- respuesta.**

Luego de la aclimatación (en las condiciones previamente detalladas en la sección 2.2.) se expusieron a 1) Control negativo (C(-), medio nutritivo Hoagland), 2) 1 µg/ L IMI (como ingrediente activo) en Hoagland, 3) 10 µg/ L IMI en Hoagland, 4) 100 µg/ L IMI en Hoagland, 5) 1.000 µg/ L IMI en Hoagland y 6) 10.000 µg/ L IMI en Hoagland durante 48 h. Luego de transcurrido el tiempo de exposición, las plantas se retiraron del medio de exposición, se secaron utilizando papel absorbente, se fraccionaron y se almacenaron a -80 °C previo enfriamiento en N<sub>2</sub> líquido. La excepción fue el tejido utilizado para la cuantificación de pigmentos, el cual fue secado utilizando papel absorbente, pesado y sumergido en 2 ml de N,N-dimetilformamida (DMF). Se utilizó una masa de tejido similar entre las muestras con un volumen constante de DMF.

Este ensayo se realizó en dos bloques (es decir, el bioensayo se realizó dos veces) debido a la cantidad de tejido que se requería: con el tejido del primer bloque se

prepararon los extractos enzimáticos para la cuantificación de enzimas antioxidantes: glutatión- S- transferasas (GST), catalasa (CAT), guajacol peroxidasa (POD) y las proteínas totales, así como la cuantificación de MDA. El tejido de las plantas del segundo bloque fue utilizado para la cuantificación de pigmentos y los niveles de peróxido de hidrógeno.

#### **2.4.2. Ensayo tiempo- respuesta.**

Para este ensayo las plantas fueron expuestas a: controles negativos (medio nutritivo Hoagland) durante 12, 24 y 48 hs (C12, C24 y C48 respectivamente) y a 100 µg/ L IMI en Hoagland durante 12, 24 y 48hs (T12, T24 y T48 respectivamente). Asimismo, se tomaron 6 muestras por ensayo al momento del inicio de los mismos, como C(-) a tiempo inicial (C0).

El ensayo se realizó en dos bloques (uno para la cuantificación de enzimas antioxidantes y MDA, y el otro para el análisis de pigmentos y peróxido de hidrógeno).

#### **2.5. Ensayo de Incorporación de IMI en *A. facetus*.**

##### **2.5.1. Condiciones de ensayo y obtención de muestras.**

Con el fin de cuantificar la incorporación y distribución de IMI en *A. facetus*, se diseñó un ensayo con las siguientes características:

**Características de los peces:** 5 especímenes por tratamiento (n=5), talla 6,81 ± 0,31 cm y peso 5,85 ± 0,75 g (media ± desvío estándar), expuestos individualmente en envases de vidrio de 3,8 L. Los peces no fueron alimentados 24 h antes de la realización del ensayo. Tanto los especímenes del C (-) como los tratados con IMI fueron sujetos del mismo cuidado en su trato y manipulación.

**Tratamientos:** cuatro tratamientos: 1) control negativo (C(-), agua de la canilla

estabilizada 24 h previo al ensayo), 2) 100 µg/ L IMI en agua de la canilla, 3) 300 µg/ L IMI en agua de la canilla y 4) 2500 µg/ L IMI en agua de la canilla. Acuarios con 3 L de medio en cada uno, exposición durante 24 y 48 h (T24 y T48). Temperatura= 20 ± 1 °C, pH= 8,4. Antes del ensayo se retiró todo resto de alimento y heces para evitar la adsorción del compuesto a los mismos.

**Muestras:** Se colectó agua al inicio del ensayo (T0) y luego al finalizar el mismo (T24) y (T48), con el propósito de cuantificar las concentraciones de IMI en cada tiempo y estudiar su estabilidad. Al finalizar los correspondientes tiempos de exposición, los peces fueron decapitados y eviscerados. Se extrajo la sangre por punción cardíaca (con jeringa heparinizada y aguja 25 G), el hígado, las branquias, el encéfalo, el tejido muscular y el intestino. Todos los tejidos se almacenaron a – 80 °C para su posterior análisis, previo enfriamiento rápido en N<sub>2</sub> líquido.

### **2.5.2. Determinación y cuantificación de IMI en *A. facetus*.**

Con el objeto de transportar las muestras al “Laboratorio de Ecotoxicología e Investigación del Impacto Ecológico de la Universidad Técnica de Berlín” (TU Berlin, Alemania) donde fueron analizadas, las mismas fueron liofilizadas en el Instituto de Investigaciones Biológicas (CONICET/ UNMdP).

La cuantificación de IMI se realizó mediante la inyección directa de las muestras de agua colectadas a T0, T24 y T48 en un cromatógrafo líquido acoplado a un espectrómetro de masas en tándem (LC- MS/ MS). Se utilizó un equipo Alliance 2695 UHPLC combinado con Micromass Quattro microTM, Waters.

Para las muestras de tejidos se realizó la extracción de IMI según Kavvalakis *et al.* (2013), con algunas modificaciones. Se utilizó todo el tejido liofilizado disponible para cada pez por separado de sangre (7 mg), hígado (35 mg), branquias (45 mg), encéfalo (10 mg), músculo (135 mg) e intestino (20 mg). Se homogeneizó con un

homogeneizador Ultra Turrax T8 (IKA Werke<sup>TM</sup>) en 2 ml de metanol. Luego se incubó por 3 h en baño ultrasónico, a una temperatura de entre 35 y 38 °C. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas (5000 rpm, 10 min) y el sobrenadante fue evaporado a temperatura ambiente hasta peso constante. Sólo las muestras de músculo fueron procesadas de esta manera dos veces, para asegurar su completa extracción. Los extractos fueron finalmente re-suspendidos en 100 µL de metanol y se mantuvieron a -20 °C hasta su cuantificación.

La separación de las muestras se realizó utilizando una precolumna SecurityGuard<sup>TM</sup> para columnas Fusion-RP HPLC (4 x 2,00 mm) y una columna Phenomenex Synergi<sup>TM</sup> Fusion RP (50 x 2,0 mm, poro de 2,5 µm). La fase móvil consistió en una solución A (agua Milli-Q conteniendo 0,1 % de ácido fórmico) y una solución B (acetonitrilo conteniendo 0,1 % de ácido fórmico) a un flujo de 0,25 mL/ min. Las condiciones del gradiente fueron: de 0 a 1 min 100 % solución A, de 1 a 2 min 50 % solución A, de 2 a 4 min, solución A disminuyendo de 50 a 25 %, de 4 a 4,5 min 25 % de solución A, de 4,51 hasta 10 min se mantuvo 100 % solución A. La temperatura de la columna se mantuvo a 25 °C y el volumen de inyección fue de 10 µL. El tiempo de retención del IMI fue de aproximadamente 4 min.

Los datos del espectro de masas se obtuvieron usando el modo ión positivo con una energía de colisión de 20 V e ionización electrospray (ESI). El IMI fue detectado a través de las transiciones 256→ 175 m/z y 256→ 209 m/z. Las condiciones de ESI utilizadas fueron: voltaje capilar 3,5 kV, voltaje de cono de 20 V, temperatura de fuente de 150 °C, temperatura de desolvatación de 300 °C, flujo de gas de desolvatación de 300 L/ h y flujo de gas de cono de 80 L/ h. El tiempo de escaneo fue de 0,5 s, con un tiempo de inter escaneo de 0,1 s. El límite de detección fue de 1 ng/ mL (relación señal/ ruido, s/n >3) y el límite de cuantificación de 5 ng/ mL (relación señal/ ruido, s/n >5).

### 2.5.3. Factores de Bioconcentración.

El cálculo de los Factores de Bioconcentración (FBC) fue realizado para cada uno de los tejidos analizados. Los FBC fueron calculados como el cociente entre la concentración de IMI en cada tejido (expresada en  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de peso seco) sobre la media de la concentración de IMI en el medio de exposición medida a los diferentes tiempos de exposición (expresada en  $\mu\text{g}/\text{L}$ ). La fórmula para el cálculo se muestra a continuación:

$$\text{FBC}_{\text{tejido}} (\text{L}/\text{Kg}) = [\text{IMI}_{\text{tejido}}] (\mu\text{g}/\text{Kg peso seco}) / [\text{IMI}_{\text{agua}}] (\mu\text{g}/\text{L}).$$

### 2.5.4. Análisis estadístico de las concentraciones de IMI y los FBC.

La comparación de las concentraciones en cada tejido entre diferentes tiempos de exposición a una misma concentración se realizó mediante el test T de Student para datos distribuidos normalmente y el test de Mann-Whitney para datos no distribuidos normalmente. El mismo criterio se utilizó para comparar los valores de FBC entre tiempos de exposición. Para analizar las diferencias entre las concentraciones testeadas a un mismo tiempo, así como para las diferencias en FBC entre concentraciones, se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) o el test de Kruskal-Wallis, según correspondiese. Un valor  $p < 0,05$  fue considerado estadísticamente significativo. Posteriormente para identificar entre que tratamiento hubo diferencias, se realizaron los test post hoc de Tuckey (luego del ANOVA) y Dunn (luego del Kruskal Wallis).

### 2.6. Ensayos para la cuantificación de biomarcadores en *A. facetus*.

Para la cuantificación de biomarcadores en *A. facetus*, se realizaron dos ensayos: uno de concentración- respuesta (dividido en dos bloques) y otro de tiempo-

respuesta. La temperatura del medio de exposición para los ensayos fue de  $16 \pm 1$  °C, y el pH fue de 8,5, similar al pH de las lagunas pampásicas de la zona donde habita *A. facetus* (Esquius y Escalante, 2012). En todos los casos se utilizó un n= 6.

### **2.6.1. Ensayo concentración- respuesta.**

**Características de los peces:** aclimatados 2 meses en acuarios de 140 L, y posteriormente una semana en acuarios de ensayo (30 L). El peso de los especímenes fue: bloque 1=  $7,26 \pm 1,36$  g, bloque 2=  $6,61 \pm 1,53$  g (media  $\pm$  D.E). La talla fue: bloque 1=  $7,07 \pm 0,35$  cm, bloque 2 =  $6,78 \pm 0,44$  cm (media  $\pm$  D.E). Los peces no fueron alimentados 24 h antes ni durante el ensayo, y tanto los especímenes del C(-) como los tratados con IMI fueron sujetos del mismo cuidado en su trato y manipulación.

**Tratamientos:** 1) Control negativo (C(-), agua de la canilla estabilizada 24 h previo al ensayo), 2) 1  $\mu$ g/ L IMI en agua de la canilla, 3) 10  $\mu$ g/ L IMI en agua de la canilla, 4) 100  $\mu$ g/ L IMI en agua de la canilla y 5) 1.000  $\mu$ g/ L IMI en agua de la canilla (en todos los casos como ingrediente activo), 48 h de exposición. Se retiraron los restos de alimento y heces para evitar la adsorción del compuesto a los mismos previo a la exposición. Se realizaron dos bloques con iguales características de exposición, debido a la cantidad de tejidos necesaria para la evaluación de todos los biomarcadores propuestos.

Luego de cumplidas las 48 h de exposición, los peces fueron retirados de los acuarios, pesados y medidos. Se les extrajo sangre por punción cardíaca, luego se realizó la eutanasia y su evisceración. Se obtuvieron hígado, branquias y encéfalo, que se almacenaron, previo enfriamiento en N<sub>2</sub> líquido, en freezer – 80 °C hasta su procesamiento. A partir de los tejidos obtenidos en el bloque 1 se realizó la cuantificación de la frecuencia de MN y AN en sangre, y de la actividad de enzimas

antioxidantes y niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en hígado, branquia y encéfalo. Por otro lado, a partir de los tejidos del bloque 2 se realizó el ensayo cometa modificado con la endonucleasa ENDO III con las muestras de sangre, y la cuantificación de los niveles de malonidialdehído (MDA) y grupos carbonilo en hígado, branquia y encéfalo.

#### **2.6.2. Ensayo tiempo- respuesta.**

El ensayo tiempo- respuesta para el análisis de biomarcadores en *A. facetus* expuesto a IMI se realizó en condiciones similares a las detalladas para los ensayos de concentración- respuesta.

**Características de los peces:** El peso de los especímenes fue de  $7,15 \pm 2,05$  g, y la talla de  $7,12 \pm 0,70$  cm (media  $\pm$  D.E.). El resto de las condiciones tanto de los peces como de los acuario fueron iguales a las referidas en el Ensayo concentración- respuesta (ver sección 2.6.1.).

**Tratamientos:** 6 acuarios de 30 L, C (-) y 100  $\mu$ g/ L IMI, ambos a 12, 24 y 48 h (T12, T24 y T48). Se retiraron los restos de alimento y heces para evitar la adsorción del compuesto a los mismos previo a la exposición.

La elección de la concentración de 100  $\mu$ g/ L IMI estuvo basada en su relevancia ambiental, y por otro lado, en trabajos previos del grupo con un formulado comercial de IMI que dieron cuenta de efectos oxidativos en branquias y genotóxicos en sangre de *A. facetus* a esa concentración (Iturburu *et al.*, 2012).

Finalizada la exposición, se obtuvo sangre para el ensayo de MN y AN y el hígado, branquia y encéfalo para la medición de enzimas antioxidantes.



## 2.7. Cuantificación de pigmentos en *M. quitense* expuesta a IMI.

Para la cuantificación de pigmentos fotosintéticos se utilizó la metodología propuesta por Inskeep y Bloom (1985) basada en la extracción de los pigmentos con DMF con modificaciones puestas a punto en el laboratorio para *M. quitense*. Se cuantificaron los pigmentos fotosintéticos de las plantas de los ensayos concentración- y tiempo-respuesta. Una vez finalizado el tiempo de exposición de los ensayos, se obtuvo una submuestra del material vegetal, se secó utilizando papel y se pesaron 0,2 g. Posteriormente, se sumergió la muestra en 2 mL DMF, y se dispuso en heladera a 4°C para su extracción durante 72 h. Durante la extracción, se protegieron las muestras de la luz, y los envases fueron sellados para evitar la posible evaporación de la DMF. Luego de la incubación se tomó una alícuota del extracto y se midió la absorbancia a 647 y 664,5 por espectrofotometría. Las mediciones se realizaron por duplicado, en cada una de las 6 muestras por tratamiento de cada ensayo. El cálculo de las concentraciones de clorofilas A y B, su relación y las clorofilas totales se realizó a partir de las fórmulas desarrolladas por Inskeep y Bloom (1985), las cuales son:

$$[\text{Clorofila A}] = (12,7 * \text{Abs}_{664,5}) - (2,79 * \text{Abs}_{647}) * v/p$$

$$[\text{Clorofila B}] = (20,7 * \text{Abs}_{647}) - (4,62 * \text{Abs}_{664,5}) * v/p$$

$$[\text{Clorofilas totales}] = (17,9 * \text{Abs}_{647} + 8,08 * \text{Abs}_{664,5}) * v/p$$

siendo  $\text{Abs}_{664,5}$  -lectura de absorbancia a 664,5 nm,  $\text{Abs}_{647}$  – lectura de absorbancia a 647 nm,  $v$  – volumen de DMF que se utilizó para la incubación,  $p$  -peso exacto de tejido utilizado para la incubación.

## **2.8. Enzimas de estrés oxidativo y contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

### **2.8.1. Extractos enzimáticos.**

Para la medición de enzimas relacionadas al estrés oxidativo en *A. facetus* se realizaron extractos celulares a partir de hígado, branquias y encéfalo. Se utilizó la metodología propuesta por Wiegand *et al.* (2000) con modificaciones de Cazenave *et al.* (2006). Fueron utilizados entre 25 y 50 g de muestra, dependiendo del tejido. Se homogenizaron en una relación de 10 mg de tejido/ 1 mL de solución amortiguadora de extracción, en hielo, utilizando un homogeneizador mecánico tipo Potter- Elvehjem. La solución de extracción consistió de solución amortiguadora fosfato de sodio (0,1 M, pH 6,5), conteniendo glicerol (20% v/v), ácido etilendiamintetracético (EDTA, por sus siglas en inglés ethylenediaminetetracetic acid, 1,0 mM) y ditioeritritol (DTE 1,4 mM). Luego de la homogenización, se removieron los restos celulares por centrifugación a 10.000 g a 4 °C en centrífuga refrigerada (HERMLE Z36HK) durante 10 min. El sobrenadante luego de la centrifugación constituyó el extracto celular a partir del cual se evaluaron las actividades enzimáticas. Dicho extracto se almacenó previo enfriamiento en N<sub>2</sub> líquido, en freezer a -80° C, hasta su procesamiento. Para *A. facetus*, a partir de estos extractos se midió la actividad de CAT, GST, GR, SOD y el contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Para *M. quitense* los extractos celulares se realizaron a partir de la metodología propuesta por Pflugmacher (2004) con modificaciones previamente puestas a punto en nuestro laboratorio (Menone *et al.*, 2008). Se pesó 1 g de cada una de las muestras (tallo y hojas, excluyendo raíces), luego se las colocó en un mortero de porcelana (previamente enfriado a -20 °C), se las enfrió con N<sub>2</sub> líquido y se las molió. El tejido molido se agitó en 2 ml del misma solución de extracción previamente mencionada para peces (ver párrafo anterior) durante 10 min. Luego se centrifugó a 10.000 g durante 10 minutos a 4 °C. Se aisló el sobrenadante resultante y se

almacenó previo enfriamiento en N<sub>2</sub> líquido, en freezer a -80° C hasta su procesamiento. Para *M. quitense*, a partir de estos extractos se midió la actividad de las enzimas CAT, GST y POD.

### **2.8.2. Actividades enzimáticas.**

La cuantificación de las actividades enzimáticas se realizó en un espectrofotómetro Shimadzu UV-210 A (DOBLE-BEAM) del Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales- UNMDP, con la longitud de onda correspondiente a cada enzima. Para todos los casos se puso a punto el tiempo adecuado de medición en cada tejido. Todas las mediciones se hicieron por duplicado.

#### **Glutación- S- transferasas (EC 2.5.1.18)**

La actividad enzimática de GST fue determinada utilizando el sustrato 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB) disuelto en etanol, según Habig *et al.* (1974). La determinación se realizó a 340 nm a 25 °C, cuantificando la tasa de conjugación de CDNB con glutatión reducido (GSH). Los tiempos de medición establecidos fueron tanto en hígado, branquia y encéfalo de 5 min. La mezcla de reacción consistió en una solución amortiguadora fosfato de sodio (100 mM, pH 6.5), GSH (60 mM), CDNB (30 mM) y la muestra (o H<sub>2</sub>O en el caso del blanco). El volumen final de reacción fue de 1220 µl. El coeficiente de extinción molar para GST es  $\epsilon = 9.6 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . La fórmula utilizada para determinar la actividad enzimática de GST, fue la siguiente:

$$\begin{aligned} &\text{Actividad GST (nkat/ mg proteína)} \\ &= [((\Delta \text{Abs}/\Delta t) * 1000 * 1220) / (40 * 9,6 * \text{prot})] / 60 \end{aligned}$$

donde " $\Delta\text{abs}$ " es la diferencia entre la absorbancia medida a tiempo 5 min y la medida a tiempo inicial 0 min,  $\Delta t$  es el tiempo en el que se observa la diferencia de absorbancia, y "prot" es la concentración de proteínas medida en el extracto enzimático.

La reacción cuantificada se esquematiza debajo:



### Glutación reductasa (EC 1.8.1.7)

La actividad de GR fue medida según Tanaka *et al.* (1994), cuantificando la tasa de reducción de NADPH ( $\epsilon$ :  $6,22 \times 10^3 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ). La actividad enzimática se cuantificó a 340 nm a 25 °C. Para hígado se estableció un  $\Delta$ tiempo de 5 min y para branquias de 3 min. En tanto, la actividad de GR en encéfalo no pudo cuantificarse, debido a que la misma fue muy baja. El sistema de reacción consistió en una solución amortiguadora fosfato de sodio (100 mM, pH 7,4), EDTA (0,5 mM), glutatión oxidado, (GSSG, 1mM) y NADPH (0,1 mM) conteniendo la muestra en un volumen total de 1,0 mL. Se calcularon los nanomoles de NADPH oxidado/ seg/ mg de proteína.

La ecuación utilizada para obtener los resultados es la siguiente:

$$\text{Actividad GR (nkat/ mg proteína)} = [((\Delta\text{Abs}/ \Delta t) * 1000 * 1000)/(50 * 6,22 * \text{prot})]/ 60$$

donde " $\Delta\text{abs}$ " es la diferencia entre la absorbancia medida a tiempo 5 min (o 3 min) y la medida a tiempo inicial 0 min, y  $\Delta t$  es el tiempo en el que se observa la diferencia de absorbancia, y "prot" es la concentración de proteínas medida en el extracto enzimático.

La reacción cuantificada se esquematiza debajo:



### **Catalasa (EC 1.11.1.6)**

La determinación de la actividad de CAT se realizó según el método de Claiborne (1985). El método se basa en la cuantificación de la disminución del contenido de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en el medio de reacción, con una lectura espectrofotométrica a 240 nm. El coeficiente de extinción molar fue de  $\epsilon: 0,0361 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . La mezcla de reacción consistió en 1.250  $\mu\text{L}$  de solución amortiguadora fosfato de sodio (50 mM, pH 7,0), 100  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrógeno 150 mM y 25  $\mu\text{L}$  de muestra, conteniendo un volumen final de 1.275  $\mu\text{L}$ . La reacción se llevó a cabo a 25 °C, y se determinó el tiempo de reacción para hígado de 5 min y para branquias de 3 min. No se fue posible cuantificar la actividad enzimática de CAT en encéfalo. La ecuación utilizada para obtener los resultados fue la siguiente:

$$\text{Actividad CAT (nkat/ mg prot.): } [((\Delta\text{Abs}/\Delta t) * 1375 * 1000) / (25 * 0,0361 * \text{prot})] / 60$$

donde " $\Delta\text{abs}$ " es la diferencia entre la absorbancia medida a tiempo final y la medida a tiempo inicial, " $\Delta t$ " es el tiempo en el que se observa la diferencia de absorbancia, y "prot" es la concentración de proteínas medida en el extracto enzimático.

La reacción cuantificada se esquematiza debajo:



### **Guajacol peroxidasa (EC 1.11.1.7)**

La determinación de la actividad de la POD se realizó según Putter (1974), utilizando como sustrato el guajacol, con modificaciones. La actividad se determinó a 436 nm, con un delta de tiempo de 5 minutos, siendo el coeficiente de extinción molar  $\epsilon$ : 25,5 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. La reacción se realizó en 860  $\mu$ L de solución amortiguadora fosfato de sodio (100 mM, pH 5), 40  $\mu$ L guajacol 100 mM y 40  $\mu$ L de peróxido de hidrógeno 200 mM, con 40  $\mu$ L de muestra en un volumen final de 980  $\mu$ L. La reacción cuantificada se esquematiza debajo:

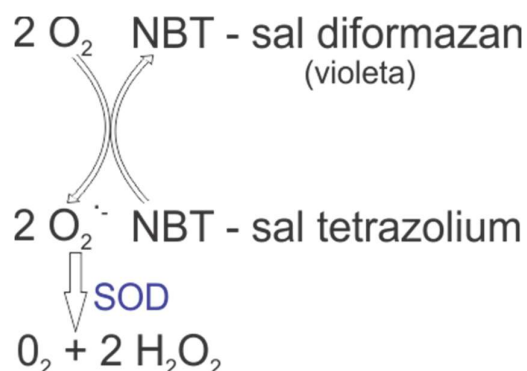


### **Superóxido dismutasa (EC 1.15.1.1)**

La actividad de SOD se determinó según Scebba *et al.* (1998) por inhibición de la reducción del nitro blue tetrazolium (NBT). El medio de reacción estuvo formado por: 20  $\mu$ L de homogenato, ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico 50 mM, pH 7,6 (HEPES, por su sigla en inglés, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid), EDTA (0,1 mM), NaHCO<sub>3</sub> (50 mM), metionina (13 mM), el tensioactivo no iónico Triton-X-100 (0,025 %), NBT (75 mM) y riboflavina (3  $\mu$ M). Las reacciones se llevaron a cabo durante 5 min a 30 °C en un baño de agua equipado con una lámpara de 22 W fluorescente (Phillips). La absorbancia de las muestras se midió a 560 nm, cada muestra por triplicado. Cada unidad de SOD (U) se define como la cantidad de enzima que produce un 50 % de inhibición de la reducción de NBT, que se convirtió en nanokatales/ mg proteínas según la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad SOD (nkatales/ mg proteína)} = \frac{[(U/60 * 10^6 U) * 10^{-9}] * 1}{\text{mg proteína}}$$

La reacción cuantificada se muestra a continuación:



### 2.8.3. Contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

En los tejidos de *A. facetus* el contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se cuantificó en hígado, branquia y encéfalo por el método FOX1 según Bellincampi *et al.* (2000). La reacción para la determinación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> según esta técnica, se basa en la oxidación de Fe<sup>2+</sup> mediada por peróxido, seguido por la reacción de Fe<sup>3+</sup> con naranja de xilenol (ácido *o*-cresolsulfoneftaleína 3', 3"-bis[metilimino], sal sódica). El producto de reacción se cuantificó a 560 nm, y para calcular el contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las muestras problema se realizó una curva estándar con las siguientes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 y 60 μM.

En los tejidos de *M. quitense* el contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se cuantificó según la técnica de Jana y Choudhuri (1982). A partir de 0,3 g de tejido vegetal se realizó la molienda con mortero y N<sub>2</sub> líquido y se homogenizó el polvo resultante con 3 mL solución amortiguadora fosfato de sodio (50 mM, pH 6,5). El homogenato se centrifugó a 10.000 g a 4 °C durante 2 min y se separó el sobrenadante. 750 μL de sobrenadante se mezclaron con 250 μL de óxido de titanio 0,1 % en ácido sulfúrico al 20%. Se cuantificó la absorbancia del compuesto resultante de la reacción (color anaranjado) a 410 nm. El contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se calculó utilizando el coeficiente de extinción molar ε: 0,28 L mmol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> y fue expresado como μmol/ g de peso fresco.

La fórmula para calcular la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue la siguiente:

$$\text{H}_2\text{O}_2 (\mu\text{mol g peso fresco}^{-1}) = (\text{Abs}_{410} \cdot V_t) / (\epsilon \cdot d \cdot V_s \cdot \text{sp/v})$$

siendo Abs<sub>410</sub> -lectura de absorbancia de la muestra por espectrofotometría a 410 nm, V<sub>t</sub> -volumen total de reacción,  $\epsilon$  -coeficiente de extinción molar (en L mmol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>);  $d$  -ancho de la cubeta; V<sub>s</sub> -volumen de la muestra en el medio de reacción y sp/v - masa de planta utilizada para la extracción/ volumen de solución amortiguadora utilizado.

## **2.9. Biomarcadores de daño oxidativo.**

### **2.9.1. Productos de peroxidación lipídica (Malondialdehído, MDA).**

#### **2.9.1.1. En *A. facetus*.**

La cuantificación de contenidos de MDA en peces se realizó en hígado, branquia y encéfalo, y se trabajó acorde al protocolo de purificación de Oakes y Van der Kraak (2003), con modificaciones ya puestas a punto en el laboratorio (Crupkin *et al.*, 2013). Se homogenizaron 50 mg de tejido en 450  $\mu$ L de KCl 1,15% más butilhidroxitolueno (BHT) 35 mM. Se agregaron 100  $\mu$ L de este homogenato a una mezcla de reacción conteniendo 3 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,8% preparado en ácido tricloroacético (TCA) 20%, 500  $\mu$ L de agua Milli Q, 200  $\mu$ L de SDS 8,1% y 200  $\mu$ L BHT (en etanol) 1,407 mM. Las muestras fueron calentadas a 95 °C por 30 min y luego enfriadas en hielo durante 10 min. Luego de una centrifugación (3000 g, 10 min, 15° C), se tomó una alícuota del sobrenadante y se midió el contenido de MDA por espectrofotometría ( $\lambda$ abs: 532 nm). El mismo se expresó en nanomoles por mg de tejido fresco usando el coeficiente de extinción molar de  $\epsilon$ : 1.56 x 10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

La fórmula con la cual se determinó de concentración de MDA en cada tejido del pez



fue la siguiente:

$$[\text{MDA}] \sim [\text{TBARS}] \text{ (nmoles / mL)} = \text{Abs} * 1 \times 10^6 / E * b$$

siendo  $\text{Abs} = \text{Abs}_{532} - \text{Abs}_{532 \text{ blanco}}$

$E = 1,56 * 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  y  $b = 1 \text{ cm}$

#### **2.9.1.2. En *M. quitense*.**

Para la cuantificación de MDA en los tejidos vegetales, se trabajó con hoja y tallo, a partir del protocolo de Shi *et al.* (2006) con modificaciones previamente puestas a punto en el laboratorio (Garanzini y Menone, 2015). Luego de los respectivos ensayos, se pesaron 0,3 g de material, se molieron en mortero con N<sub>2</sub> líquido y se agitaron en 2 mL de TCA 0,1 % durante 15 min. El homogenato resultante se dividió en dos tubos, uno de los cuales se utilizó como blanco. Los tubos se centrifugaron a 10.000 g durante 10 min. De los sobrenadantes, 0,5 mL se mezclaron con TCA 20 % (en el caso del blanco) y con TBA 0,5 % en TCA 20 % (en el caso de la muestra), y se hicieron reaccionar por 30 minutos en baño María a 95 °C. Luego de transcurrida la reacción los tubos se colocaron en hielo durante 10 minutos, a fin de frenar la misma. Las muestras se volvieron a centrifugar a 10.000 g durante 10 min. El nuevo sobrenadante se separó y se midió la absorbancia del mismo a 532 y a 600 nm.

A partir de estas mediciones, se calculó la concentración de TBARS con la siguiente fórmula:

$$[\text{MDA}] \sim [\text{TBARS}] \text{ (nmoles / mL)} = \text{Abs} * 1 \times 10^6 / E * b$$

siendo  $\text{Abs} = (\text{Abs}_{532} - \text{Abs}_{600}) - (\text{Abs}_{532 \text{ blanco}} - \text{Abs}_{600 \text{ blanco}})$

$E = 1,56 * 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  y  $b = 1 \text{ cm}$

## **2.9.2. Oxidación de proteínas (grupos carbonilo).**

### **2.9.2.1. Cuantificación de grupos carbonilo en *A. facetus*.**

La determinación de la oxidación de proteínas se realizó a partir de la cuantificación de la concentración de grupos carbonilo en hígado, branquia y encéfalo. Se utilizó el protocolo de Caballero *et al.* (2011), con modificaciones puestas a punto en esta tesis. Los tejidos obtenidos de ensayos previos y almacenados a -80 °C se homogenizaron en solución amortiguadora (0,15 M NaCl, 1 mM EDTA, 20 mM Tris.HCl) a 4 °C utilizando un homogeneizador mecánico tipo Potter- Elvehjem y una relación de 20 mg de tejido/ 2 mL solución amortiguadora. Del homogenato resultante se dividieron dos alícuotas de 0,75 mL por muestra (una de las cuales sirvió de blanco) y se hicieron reaccionar con 0,75 mL de TCA 20 % cada uno. Luego se centrifugaron a 6000 g a 4 °C durante 5 min. Se descartaron los sobrenadantes y al precipitado se le agregó 0,75 mL de HCl 2 N al blanco y 0,75 de HCl 2N conteniendo dinitrofenilhidrazina (DNPH) 0,2 % a la muestra. Ambos tubos se agitaron por 1 hora en oscuridad a 25 °C. Terminada la agitación se reprecipitaron las proteínas con 0,75 mL de TCA 20 %. Se realizó una nueva centrifugación de 10 minutos a 10.000 rpm y 4 °C luego de la cual se descartó el sobrenadante y se lavaron los respectivos precipitados con etanol/ acetato de etilo (1:1) 3 veces, dejándolos secar luego del último lavado. Posteriormente se agregó a cada tubo 0,75 ml de Guanidina- HCl 6 M y se mezcló, para luego centrifugar durante 10 min a 10.000 rpm y 4 °C y conservar los sobrenadantes. Se determinó la absorbancia de las muestras tratadas con DNPH a 370 nm y se le restó la de los respectivos blancos sin DNPH. Para transformar el dato de absorbancia a nanomoles de DNPH incorporados/ mg de proteína, se utilizó el coeficiente de extinción molar  $\epsilon = 21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para hidrazonas alifáticas. Así la fórmula para determinar la concentración de grupos carbonilo resultó en:

**[Carbonilo] ~ [DNPH incorp.] (nmoles/ mg de proteína) = Abs \* 1 x 10<sup>3</sup> / 21 \* prot**

siendo “Abs” = Abs<sub>370</sub> – Abs<sub>370blanco</sub> y “prot” = concentración de proteínas en mg/ ml

## **2.10. Determinación de la concentración de proteínas.**

La concentración de proteínas totales de las muestras se determinó de acuerdo a Bradford (1976) usando albúmina bovina (BSA) como estándar. Las diferentes curvas estándar se detallan en el Apartado 2 del Apéndice. Se cuantificó la concentración de proteínas en los extractos enzimáticos así como en los extractos de grupos carbonilo. Para la reacción se utilizaron 0,1 ml de muestras y 1 ml de reactivo de Bradford (Apartado 3 del Apéndice). Las muestras se midieron espectrofotométricamente a 595 nm por triplicado y luego de 10 min de reacción. Los valores de absorbancia se ingresaron en una curva estándar de concentraciones conocidas de BSA. Las concentraciones de BSA utilizadas para las curvas fueron: 0,005, 0,01, 0,025, 0,035, 0,05, 0,1 y 0,2 mg/ mL. En el caso de que las concentraciones de proteínas de las muestras excedieran el rango de la curva (principalmente en el caso de muestras de peces), se realizaron las correspondientes diluciones, pudiendo ser las mismas en una relación 1:10, 1:20 o 1:50 según correspondiese.

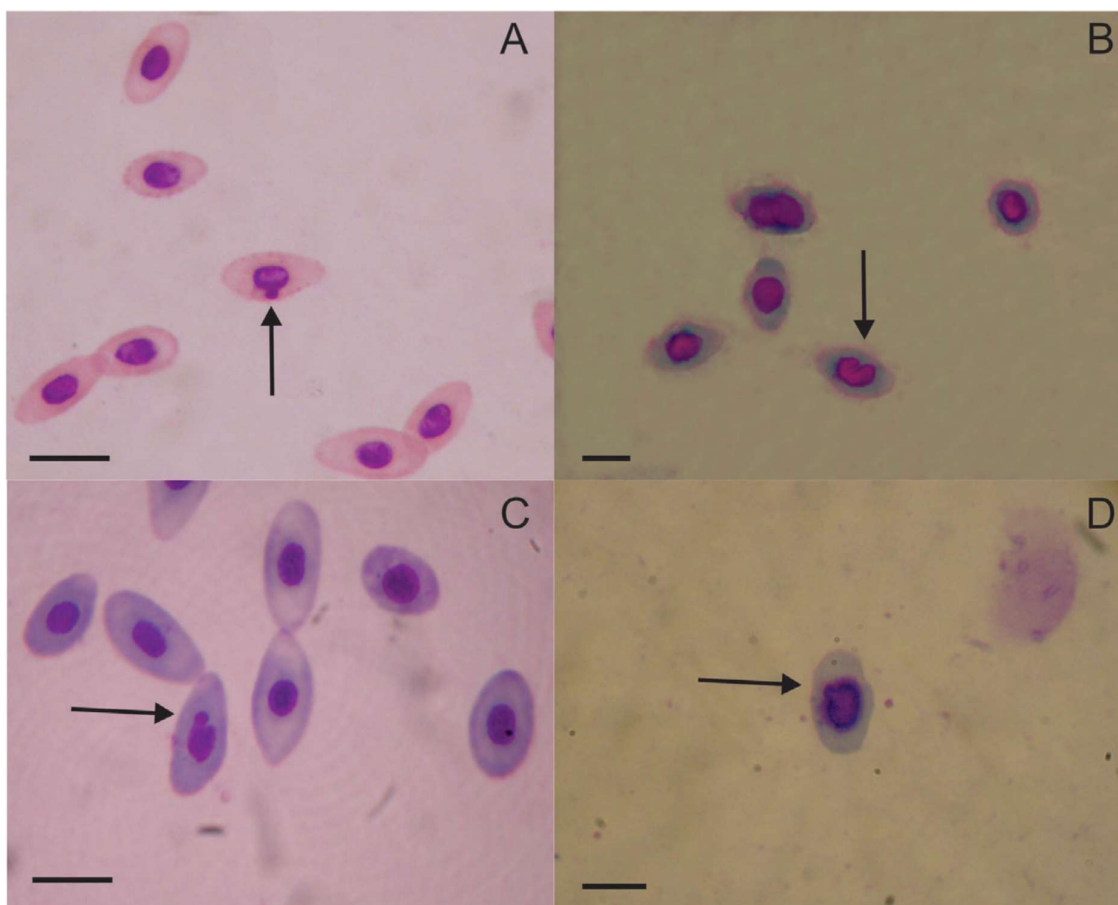
## **2.11. Marcadores de Genotoxicidad**

### **2.11.1. Micronúcleos y Anormalidades Nucleares en sangre de *A. facetus*.**

Para cada animal se obtuvo una muestra de sangre por punción cardíaca con jeringas heparinizadas, y se realizaron dos o más extendidos (según la calidad y cantidad de la sangre), aplicando una gota de la misma en un portaobjetos previamente lavado con etanol 96%. Se realizó la fijación con metanol absoluto durante 15 min, y secó a temperatura ambiente. La tinción de los preparados se realizó con una solución Giemsa 15% durante 15-18 min. Para determinar la

frecuencia de MN y de AN se analizaron 2000 eritrocitos (1.000 por preparado) para cada animal por microscopía óptica (Microscopio Olympus CX31), bajo un aumento de 1000X. Los preparados fueron evaluados de manera codificada y aleatoria utilizando una revisión ciega de un solo observador (el que suscribe). Sólo se incluyeron células con membranas celulares y nucleares intactas, reconocibles como eritrocitos. Los eritrocitos en peces poseen un núcleo redondeado a ovoide y bien delimitado. A diferencia del resto de las células sanguíneas, el eritrocito teñido con solución Giemsa 15% posee una marcada diferencia de coloración del núcleo respecto del citoplasma.

Se identificó como MN a cada partícula citoplasmática no refractaria, de forma ovoide y bordes delimitados, y del mismo color que el núcleo celular. Se cuantificó la frecuencia de MN sobre 1.000 células en todos los casos, promediando ambas determinaciones (ambos extendidos). Para la caracterización de AN se adoptó el criterio de Carrasco *et al.* (1990) que las diferencia en “blebbed” (núcleos con una pequeña evaginación de su envoltura que contiene cromatina), “lobed” (núcleos con evaginaciones mayores a las “blebbed”) y “notched” (núcleos con una hendidura con ausencia de cromatina, Figura 13). Se calcularon las frecuencias de cada tipo de anomalía como el número de cada una de ellas sobre 1.000 células contadas, promediando ambas determinaciones (extendidos).



**Figura 13: Microfotografías de eritrocitos de *Australoheros facetus* expuestos a imidacloprid.** A) Micronúcleo, B) Núcleo “notched”, C) Núcleo “lobed”, D) Núcleo “blebbed”. Las flechas indican la anomalía, las barras indican 10 µm. (Fotos del autor).

### 2.11.2. Ensayo cometa y oxidación de bases del ADN en *A. facetus*.

El análisis del daño al ADN en *A. facetus* expuesto a IMI también se evaluó mediante la utilización de electroforesis de una sola célula o ensayo cometa (EC). La puesta a punto del mismo para *A. facetus* se realizó con la colaboración de la Dra. Fernanda Simoniello (Cátedra de Toxicología, Farmacología y Bioquímica Legal, Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas, Universidad Nacional del Litoral). El ensayo se realizó a partir de muestras de sangre, siguiendo el protocolo de Singh *et al.* (1988). El EC se modificó a partir de la técnica desarrollada por Collins (1996) con la utilización de nucleasas para detectar oxidación de bases. En el caso de esta tesis se utilizó la enzima endonucleasa III (ENDO III), que actúa cortando la hebra de ADN al encontrar bases pirimidínicas oxidadas.

#### **2.11.2.1. Preparación de portaobjetos.**

Previamente a la obtención de los células se procedió a realizar la primer capa de recubrimiento de los portaobjetos con agarosa de punto de fusión normal NMP (por su sigla en inglés, Normal Melting Point) (1 % v/v). Para ello se pesó la agarosa y se la disolvió en H<sub>2</sub>O destilada a 90 ° C. La agarosa fundida se colocó en un vaso tipo Coplin, el cual se mantuvo en baño termostático a 50 °C. Los portaobjetos se colocaron en la solución de agarosa por unos segundos, luego se los retiró y se limpió el envés de los mismos cuidadosamente. Se los dejó secar y se los conservó hasta su utilización.

#### **2.11.2.2. Obtención de muestras y viabilidad.**

Se obtuvieron muestras de sangre de *A. facetus* por punción cardíaca, con jeringa heparinizada. Cada muestra se diluyó en solución amortiguadora fosfato salina PBS (por sus siglas en inglés, Phosphate Buffer Saline) en una relación sangre: PBS 1:40. Los componentes de la solución PBS se detallan en el Apartado 4 del Apéndice. La viabilidad de las suspensiones celulares se evaluó por medio de tinción fluorescente con bromuro de etidio: naranja de acridina (1:1). Se realizaron cuatro portaobjetos por muestra, dos de los cuales luego fueron tratados con la enzima, y los otros dos sólo con la solución amortiguadora para la enzima.

#### **2.11.2.3. Montado de células y electroforesis.**

De las diluciones de sangre, se tomaron 4 µL y se mezclaron con 100 µL de agarosa de bajo punto de fusión 1% (LMP, por sus siglas en inglés, Low Melting Point). Esta mezcla se sembró en cada uno de los cuatro portaobjetos, previamente cubiertos por una capa de agarosa NMP 1 % gelificada. Se realizó un control positivo (C(+)) *in vitro* a partir de sangre de peces no expuestos a IMI, tratando los preparados con

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 µM durante 10 min. Los portaobjetos, tanto los tratados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como los no tratados, se dejaron gelificar durante 15 min en heladera, y luego se sumergieron en solución de lisis (Apartado 5, Apéndice) fría y preparada en el momento por al menos 1 h. Luego, se incubaron con 50 µL de enzima (dilución 1/3000) o su respectiva solución amortiguadora (HEPES 40 mM, KCl 0,1 M, EDTA 0,5 mM, BSA 0,2 mg/ mL, pH 8,0 con KOH). Posteriormente los portaobjetos se colocaron en la cuba electroforética con la solución de corrida (NaOH 0,3 M, EDTA 1mM) para permitir la desnaturalización del ADN durante 10 min. Luego se llevó a cabo la corrida electroforética a 24 V, 0,3 A durante 10 min. Al finalizar la misma, las muestras se neutralizaron con solución Tris 400 mM, pH 7,5, en frío.

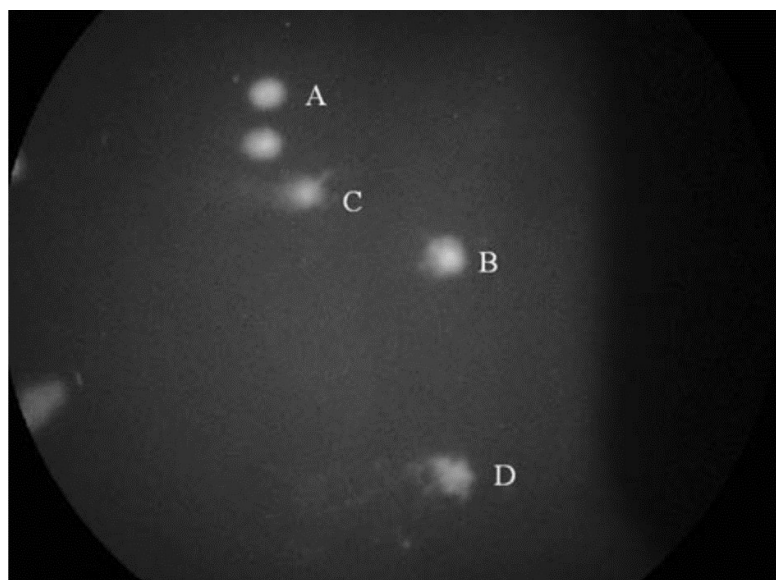
#### **2.11.2.4. Observación de preparados y cálculo del índice de daño.**

Los preparados se tiñeron con el colorante 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI, por su sigla en inglés 4',6-diamidino-2-phenylindole, 3,5 µg/ mL) y se realizó el recuento en microscopio de fluorescencia (Mikoba Serie F-350) con un aumento de 400 X. Todos los procedimientos se llevaron a cabo en la oscuridad para evitar daño adicional al ADN.

Se analizaron visualmente un total de 100 células por preparado seleccionadas aleatoriamente y se clasificaron en una escala de 1-4, dependiendo del grado de daño; siendo 1 la categoría con menor daño y 4 la categoría con mayor daño (Figura 14). Se calculó un índice de daño para el ensayo “cometa” (IDEC) según Simoniello *et al.* (2009) de la siguiente manera:

$$\text{IDEC} = (1 * n1) + (2 * n2) + (3 * n3) + (4 * n4)$$

siendo “n” el número de células en cada categoría de daño.



**Figura 14: Microfotografía de eritrocitos de pez sometido al ensayo cometa.** Se observan las categorías de daño. A: categoría 0 (sin daño). B. Categoría 1 (levemente dañada). C. Categoría 2 (daño medio). D. Categoría 3 (altamente dañado). (Fuente: Simoniello *et al.*, 2009)

Los sitios ENDO se calcularon como la diferencia entre el IDEC de las muestras tratadas con la enzima ENDO III menos el ID de las muestras sin tratar.

## 2.12. Análisis Estadístico de Biomarcadores.

De cada tratamiento (tiempo o concentración), tanto en plantas como en peces se contó con 6 réplicas independientes ( $n=6$ ). Todas las muestras de todos los biomarcadores se midieron por duplicado. En los ensayos de concentración-respuesta se utilizaron test de ANOVA para evaluar las diferencias en las respuestas de los biomarcadores entre los distintos tratamientos. Previo al test de ANOVA se evaluaron los supuestos de normalidad y homocedasticidad con los test de D'agostino-Pearson y Bartlett, respectivamente. *A posteriori* del test de ANOVA, se realizó el test de Dunnett para comparar diferencias entre el C(-) y cada uno de los demás tratamientos. Los biomarcadores que no cumplieron los supuestos para el test de ANOVA, se analizaron por el test de Kruskal-Wallis, utilizando a posteriori el test de Dunn para comparar el C(-) con cada uno de los demás tratamientos (Zar,



1999).

En el caso de los ensayos de tiempo- respuesta, se realizó la comparación de la respuesta de los biomarcadores entre los controles (C0, C12, C24, C48) mediante el test de ANOVA si cumplían los supuestos de normalidad y homocedasticidad, o Kruskal-Wallis en el caso de que los supuestos no se cumplieran. Esta comparación se realizó con el objeto de analizar la estabilidad de cada biomarcador en el tiempo. Luego se comparó mediante el test t de Student, para cada tiempo de exposición, cada tratamiento con IMI respecto a su C(-). En este caso, si no se cumplía el supuesto de normalidad, se utilizó el test de Mann-Whitney (Zar, 1999).

Se realizaron pruebas estadísticas para determinar las relaciones lineales en los marcadores que dieron diferencias significativas con las pruebas de ANOVA. Se buscó determinar relaciones lineales entre la concentración de IMI y la respuesta del respectivo biomarcador, mediante la prueba de regresión lineal simple.

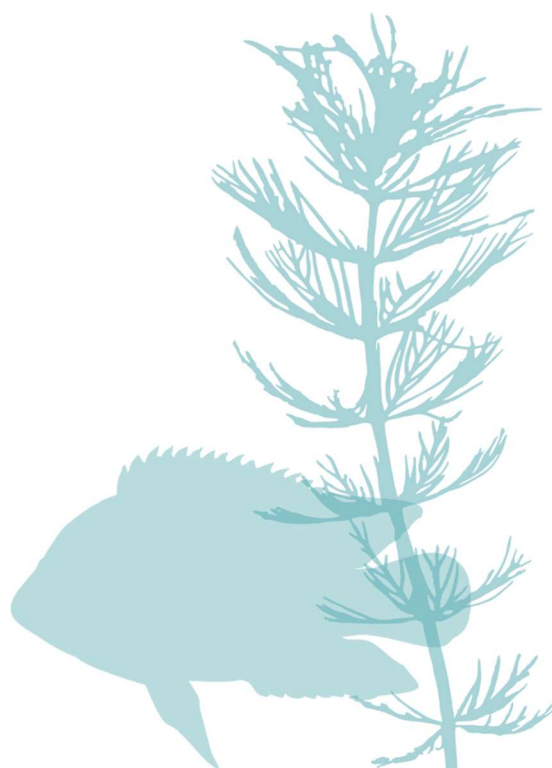
## Bibliografía:

- Arts G, Davies J, Dobbs M, Ebke P, Hanson M, Hommen U, Knauer K, Loutseti S, Maltby L, Mohr S, Poovey A y Poulsen V. 2010. AMEG: the new SETAC advisory group on aquatic macrophyte ecotoxicology. *Environmental science and pollution research international*, 17(4), 820 – 823.
- Bellincampi D, Dipierro N, Salvi G, Cervone F y De Lorenzo G. 2000. Extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced by oligogalacturonides is not involved in the inhibition of the auxin-regulated rolB gene expression in tobacco leaf explants. *Plant Physiology*, 122(4), 1379–1385.
- Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dyebinding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Caballero VJ, Mendieta JR, Giudici AM, Crupkin AC, Barbeito CG, Ronchi VP, ... y Conde RD. 2011. Alternation between dietary protein depletion and normal feeding cause liver damage in mouse. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 67(1), 43–52.
- Carrasco KR, Tilbury KL y Myers MS. 1990. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ bioindicator of chemical contaminant effects. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 47, 2123-2136.
- Cazenave J, Bistoni MDLA, Pesce SF y Wunderlin DA. 2006. Differential detoxification and antioxidant response in diverse organs of *Corydoras paleatus* experimentally exposed to microcystin-RR. *Aquatic Toxicology*, 76(1), 1–12.
- Claiborne A. 1985. Catalase activity. In: Greenwald RA (ed). *Handbook of methods in oxygen radical research*. CRC, Boca Raton, pp 283–284.
- Collins AR, Dusinska M, Gedik CM y Stetina R. 1996. Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker? *Environmental Health Perspectives*, 104(3), 465 – 469.
- Crupkin AC, Carriquiriborde P, Mendieta J, Panzeri AM, Ballesteros ML, Miglioranza KSB y Menone ML. 2013. Oxidative stress and genotoxicity in the South American cichlid, *Australoheros facetus*, after short-term sublethal exposure to endosulfan. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 105(2), 102–110.
- Esquius KS y Escalante AH. 2012. Periphyton assemblages and their relationships with environmental variables in a eutrophic shallow lake from Pampa Plain, Argentina. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 7(2), 57-72.
- Garanzini DS y Menone ML. 2014. Azoxystrobin Causes Oxidative Stress and DNA Damage in the Aquatic Macrophyte *Myriophyllum quitense*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 94(2), 146–151.
- Habig WH, Pabst MJ y Jakoby WB. 1974. Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in

- mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry*, 249(22), 7130–7140.
- Inskeep WP y Bloom PR. 1985. Extinction Coefficients of Chlorophyll a and b in *N,N*-Dimethylformamide and 80% Acetone. *Plant Physiology*, 77, 483–485.
  - Iturburu FG, Panzeri A, Crupkin AC y Menone ML. 2012. Inhibition of oxidative stress enzyme activities and genotoxicity of the insecticide imidacloprid in the freshwater fish *Australoheros facetus*. SETAC Europe 22nd Annual Meeting 2012. Berlín, Alemania. 20-24/05/2012.
  - Jana S y Choudhuri MA. 1982. Glycolate metabolism of three submersed aquatic angiosperms during ageing. *Aquatic Botany*, 12(C), 345–354.
  - Kavvalakis MP, Tzatzarakis MN, Theodoropoulou EP, Barbounis EG, Tsakalof AK y Tsatsakis AM. 2013. Development and application of LC-APCI-MS method for biomonitoring of animal and human exposure to imidacloprid. *Chemosphere*, 93(10), 2612–2620.
  - Menone ML, Pesce SF, Díaz MP, Moreno VJ y Wunderlin DA. 2008. Endosulfan induces oxidative stress and changes on detoxication enzymes in the aquatic macrophyte *Myriophyllum quitense*. *Phytochemistry*, 69(5), 1150–1157.
  - Oakes KD y Van Der Kraak GJ. 2003. Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. *Aquatic Toxicology* 63, 447-463.
  - OECD. 2014. OECD guidelines for the testing of chemicals: TG 238, sediment- free *Myriophyllum spicatum* toxicity test. <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/> (consultado 10/06/2017).
  - Pflugmacher S. 2004. Promotion of oxidative stress in the aquatic macrophyte *Ceratophyllum demersum* during biotransformation of the cyanobacterial toxin microcystin-LR. *Aquatic Toxicology*, 70(3), 169–78.
  - Pütter J. 1974. En: Bergmeyer HU & Bernt E. (ed). *Methods of enzymatic analysis*. (Vol. 2). Academic Press, New York, pp 685- 690.
  - Scebba F, Sebastiani L y Vitagliano C. 1998. Changes in activity of antioxidative enzymes in wheat (*Triticum aestivum*) seedlings under cold acclimation. *Physiologia Plantarum*, 104, 747 – 752.
  - Shi Q, Zhu Z, Xu M, Qian Q y Yu J. 2006. Effect of excess manganese on the antioxidant system in *Cucumis sativus* L. under two light intensities. *Environmental and Experimental Botany*, 58 (1-3), 197–205.
  - Simoniello MF, Gigena F, Poletta G, Loteste A, Kleinsorge E, Campana, M, ... y Parma MJ. 2009. Alkaline comet assay for genotoxic effect detection in neotropical fish *Prochilodus lineatus* (Pisces, Curimatidae). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 83(2), 155–158.

- Singh NP, McCoy MT, Tice RR y Schneider EL. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental cell research*, 175(1), 184-191.
- Tanaka K, Sano T, Ishizuka K, Kitta K y Kawamura Y. 1994. Comparison of properties of leaf and root glutathione reductases from spinach. *Physiologia Plantarum*, 91(3), 353–358.
- Wiegand C, Pflugmacher S, Oberemm A y Steinberg C. 2000. Activity development of selected detoxication enzymes during the ontogenesis of the zebrafish (*Danio rerio*). *International Review of Hydrobiology*, 85(4), 413– 422.
- Zar JH. 1999. *Bioestatistical analysis*. Prentice Hall, 4ta Edición. New Jersey, 718 pp.

3. Capítulo 1: Crecimiento, concentración de  
clorofilas y estrés oxidativo en *Myriophyllum*  
*quitense* expuesta a imidacloprid.



A continuación se describirán los resultados provenientes del análisis de biomarcadores de crecimiento y clorofilas de *M. quitense* expuesta a IMI durante 14 días, así como del análisis de pigmentos y biomarcadores de estrés oxidativo de *M. quitense* expuesta a IMI en ensayos concentración- y tiempo- respuesta de forma aguda.

### **3.1. Resultados**

#### **3.1.1. Crecimiento**

Como primera aproximación a la evaluación de los posibles efectos de IMI sobre *M. quitense* se realizó un bioensayo de exposición para evaluar los efectos en su crecimiento. Luego de 14 días de exposición a 10, 100, 1.000, 10.000 y 20.000 µg/L IMI, no se observaron modificaciones ni en el peso fresco, ni en la longitud ni en el peso seco respecto a los valores del C(-) ( $p > 0,05$ , Tabla 6). Respecto a la cantidad de verticilos, raíces y ramificaciones no se realizó un análisis estadístico debido a la cantidad reducida de muestras (tanto tratadas como no tratadas con IMI) que mostraron cambios entre el inicio y la finalización de la exposición.

Tratamiento	$\Delta$ Peso fresco (mg)	$\Delta$ Longitud (mm)	Peso seco (mg/cm)
Control (-)	27,5 $\pm$ 20,5	1,6 $\pm$ 1,6	160,9 $\pm$ 10,0
10 $\mu$ g/L IMI	25,8 $\pm$ 17,8	3,1 $\pm$ 0,8	157,6 $\pm$ 35,9
100 $\mu$ g/L IMI	23,3 $\pm$ 18,3	2,3 $\pm$ 1,2	164,4 $\pm$ 13,0
1.000 $\mu$ g/L IMI	20,8 $\pm$ 15,1	2,7 $\pm$ 1,8	162,7 $\pm$ 15,6
10.000 $\mu$ g/L IMI	20,8 $\pm$ 16,8	2,9 $\pm$ 1,1	157,5 $\pm$ 19,7
20.000 $\mu$ g/L IMI	27 $\pm$ 17,8	2,8 $\pm$ 1,8	156,3 $\pm$ 10,7

**Tabla 6: Ensayo de Concentración- Respuesta en *Myriophyllum quitense* durante 14 días. Crecimiento.** Valores de cambio de peso fresco y longitud y peso seco final de plantas expuestas a diferentes concentraciones de imidacloprid durante 14 días.

### 3.1.2. Pigmentos

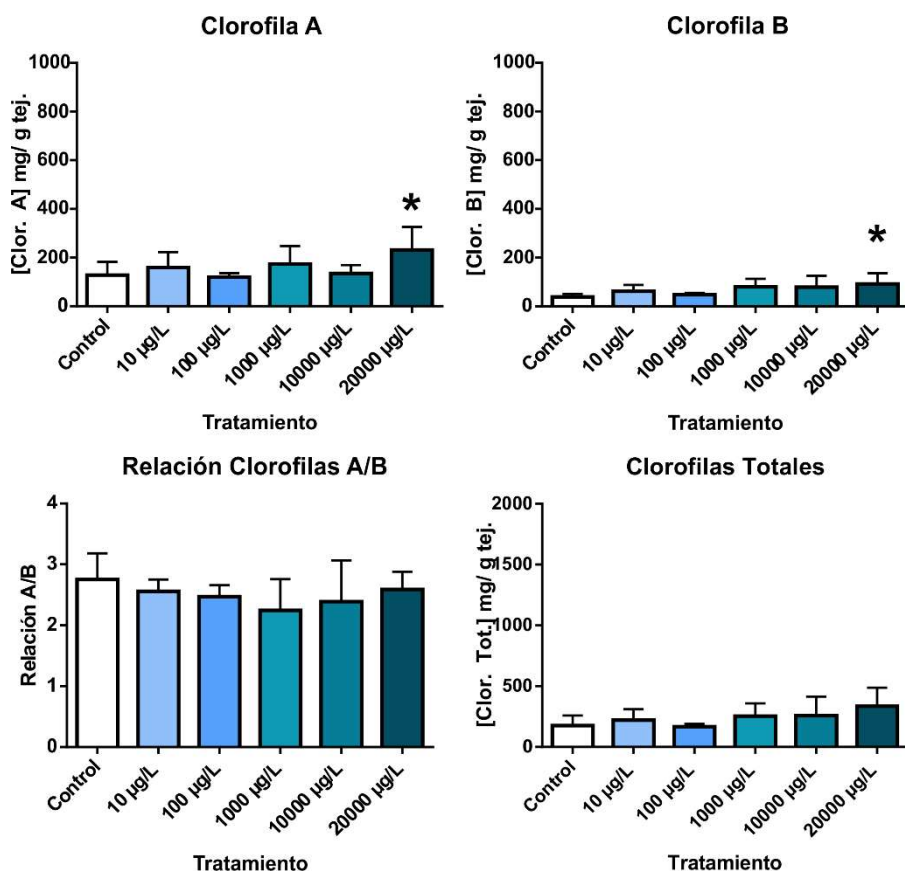
Los resultados aquí expuestos surgieron de tres bioensayos diferentes: el bioensayo a 14 días para determinar la posible inhibición de crecimiento, el bioensayo concentración- respuesta a 48 hs, y el bioensayo tiempo- respuesta a 100  $\mu$ g/L IMI

#### 3.1.2.1. Bioensayo a 14 días.

Se cuantificó la concentración de clorofilas A, B y totales y la relación A/B al inicio de la exposición (T0) y se la comparó con los valores del C(-) a los 14 días. Tanto la concentración de clorofila A, como la B y la clorofila total fueron mayores en T0 que a los 14 días ( $p < 0,05$ ).

Tanto la concentración de clorofila A como de clorofila B se incrementaron al exponer a *M. quitense* a 20.000  $\mu$ g/L IMI durante 14 días respecto al C (-) ( $p < 0,05$ , Figura 15). Por otro lado, la relación de clorofilas A/B y la concentración de clorofilas totales no evidenciaron diferencias significativas al exponer a *M. quitense*

durante 14 días a 10, 100, 1.000, 10.000 o 20.000  $\mu\text{g/L}$  IMI ( $p > 0,05$ , Figura 15).



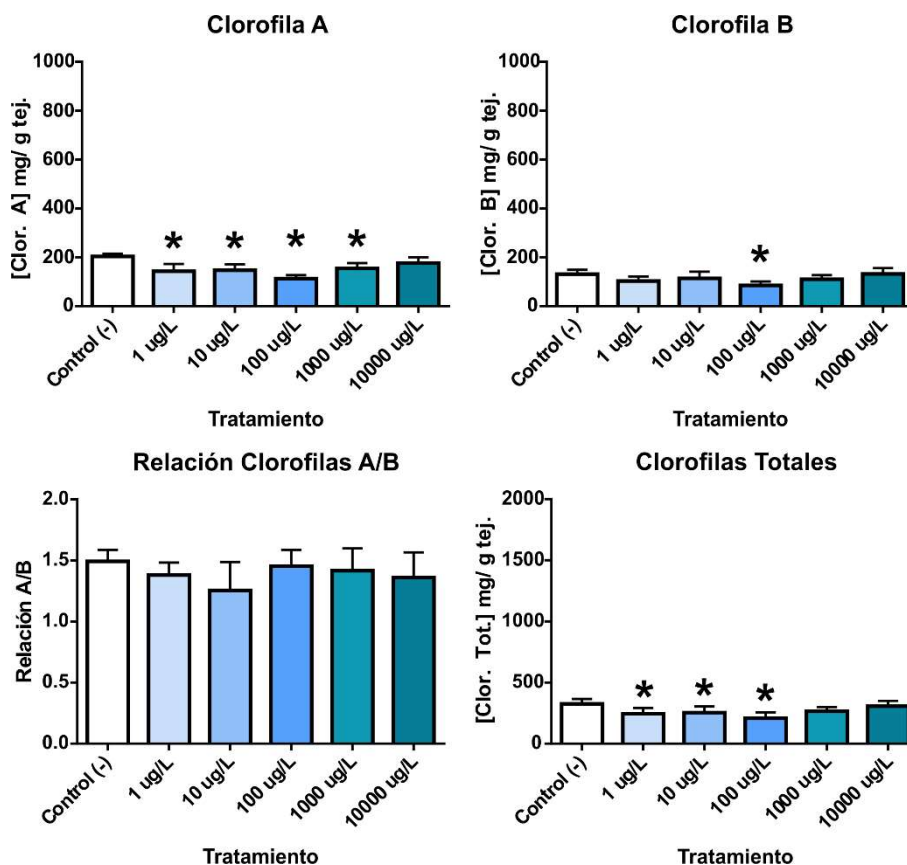
**Figura 15: Curvas Concentración- Respuesta *Myriophyllum quitense* a 14 días. Clorofilas.** Concentración de clorofilas A, B y total y su relación en plantas expuestas a diferentes concentraciones de imidacloprid durante 14 días. Test utilizados: clorofila A ANOVA, clorofila B, relación A/B y totales Kruskal- Wallis. \*: diferencias significativas respecto al control negativo ( $p < 0,05$ ).

### 3.1.2.2. Bioensayo Concentración- Respuesta durante 48 hs.

En este ensayo se observó que las concentraciones de 1, 10, 100, y 1.000  $\mu\text{g/L}$  IMI disminuyeron la concentración de clorofila A en *M. quitense* ( $p < 0,05$ , Figura 16). Por otro lado, la concentración de clorofila B disminuyó solo a la concentración de 100  $\mu\text{g/L}$  IMI ( $p < 0,05$ , Figura 16). La relación de clorofilas A/B en



las plantas expuestas a concentraciones crecientes de IMI no se modificó. ( $p > 0,05$ ), mientras que la concentración de clorofila total se redujo a 1, 10 y 100  $\mu\text{g/L}$  IMI ( $p < 0,05$ , Figura 16).

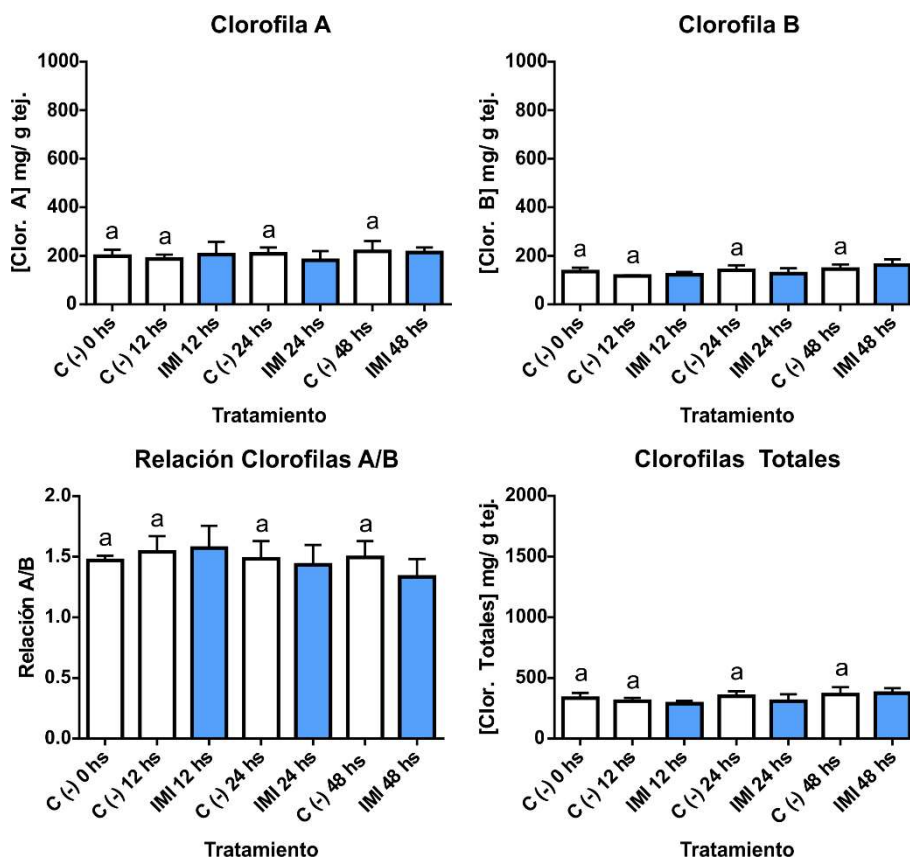


**Figura 16: Curvas Concentración- Respuesta *Myriophyllum quitense* a 48 hs. Clorofilas.** Concentración de clorofilas A, B y total y su relación en plantas expuestas a diferentes concentraciones de imidacloprid durante 48 hs. Test utilizado: ANOVA. \*: diferencias significativas respecto al control negativo ( $p < 0,05$ ).

### 3.1.2.3. Bioensayo Tiempo- respuesta a 100 $\mu\text{g/L}$ IMI.

Para el bioensayo de tiempo- respuesta la exposición de las plantas tanto a 12, 24 y 48 hs no produjo diferencias significativas en ninguno de los cuatro biomarcadores mencionados, comparados con sus respectivos C(-) ( $p > 0,05$ ,

Figura 17). Por otro lado, los valores de los C(-) no se modificaron a los distintos tiempos analizados para ninguno de los cuatro parámetros: clorofila A, clorofila B, relación entre clorofilas A/B y clorofilas totales ( $p > 0,05$ , Figura 17).



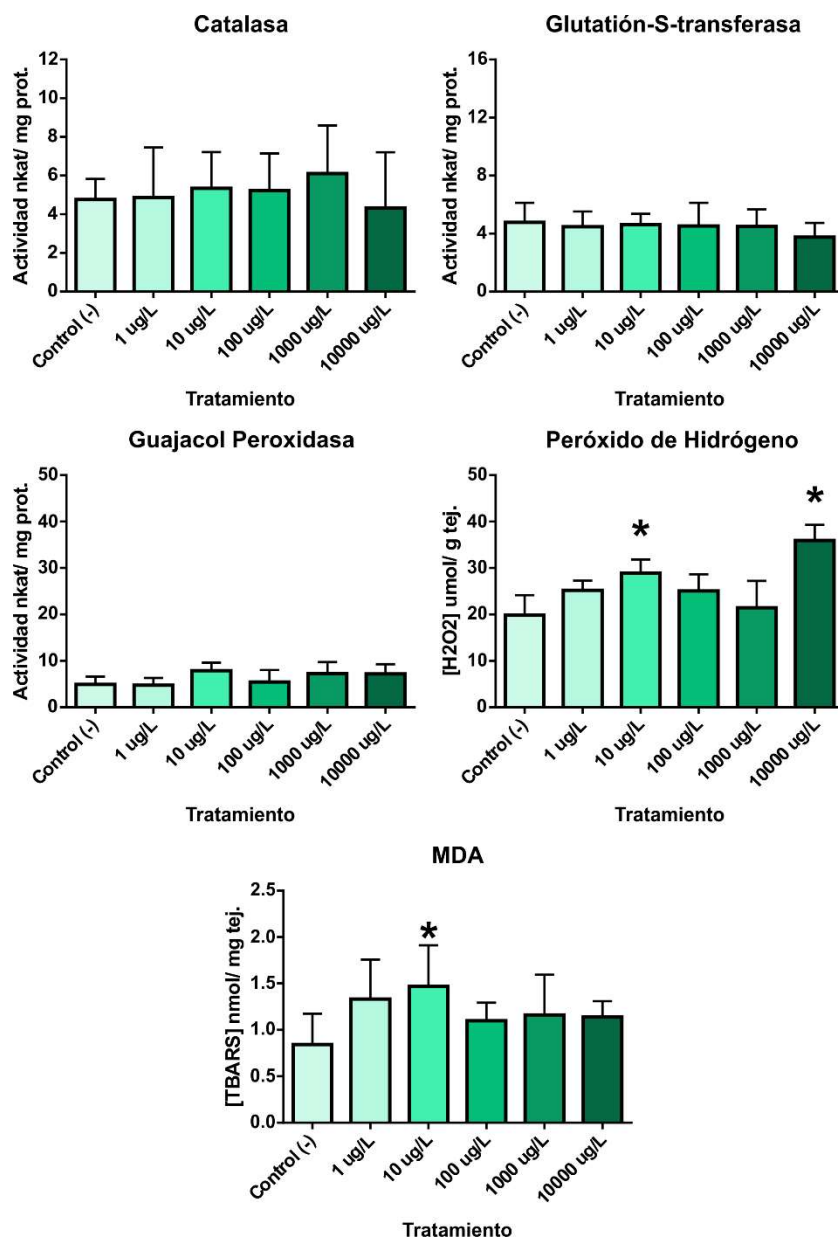
**Figura 17: Curvas Tiempo- Respuesta *Myriophyllum quitense* a 12, 24 y 48 hs. Clorofilas.** Concentración de clorofilas A, B y total y su relación en plantas expuestas a diferentes tiempos a 100 µg/L imidacloprid. Letras diferentes marcan diferencias significativas entre los controles (test de ANOVA,  $p < 0,05$ ).

### 3.1.3. Biomarcadores de Estrés oxidativo

#### 3.1.3.1. Bioensayo Concentración- Respuesta durante 48 hs.

En este bioensayo no se observaron cambios en la actividad de las enzimas evaluadas (CAT, GST, POD) a ninguna de las concentraciones ensayadas ( $p >$

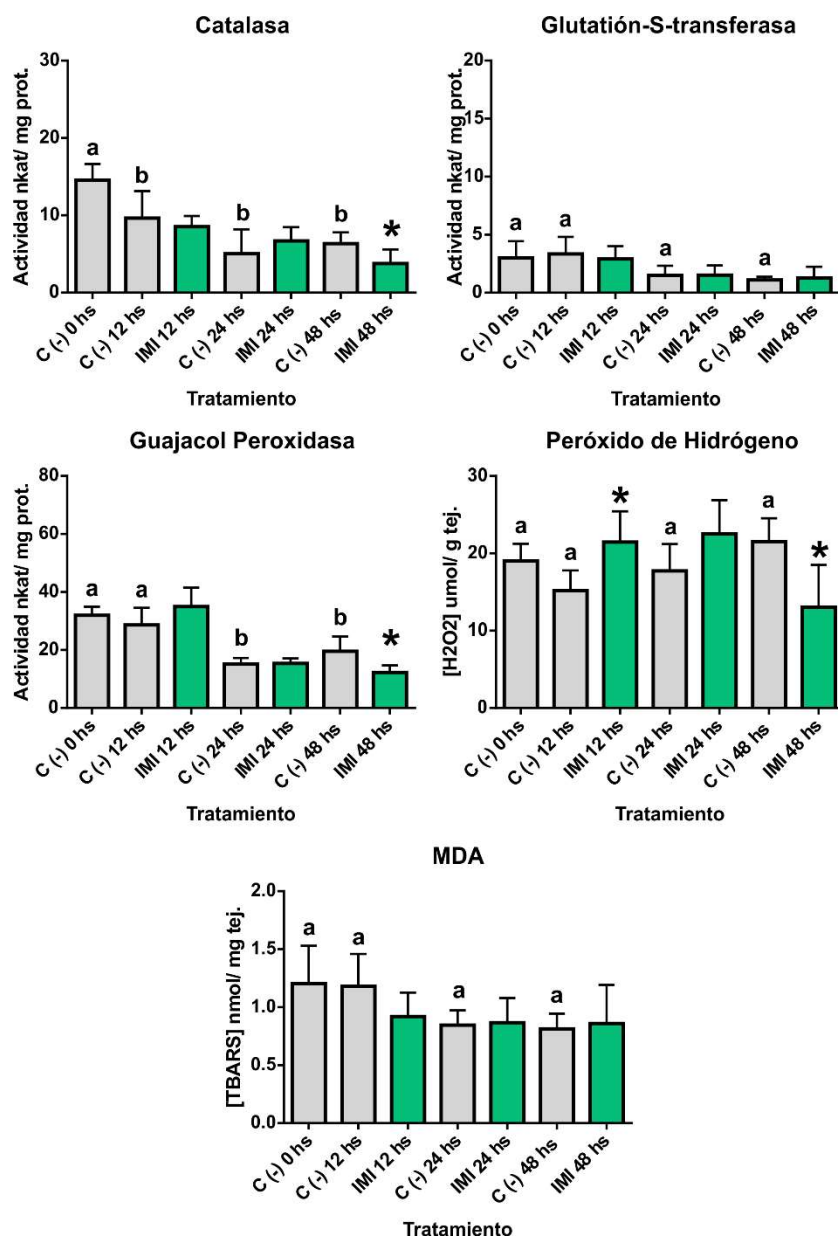
0,05, Figura 18). Por otro lado, las concentraciones de  $H_2O_2$  se incrementaron a concentraciones de 10 y 10.000  $\mu g/L$  IMI ( $p > 0,05$ , Figura 18). La concentración de MDA aumentó con una exposición de 10  $\mu g/L$  IMI ( $p > 0,05$ , Figura 18).



**Figura 18: Curvas Concentración- Respuesta *Myriophyllum quitense*. Estrés y Daño Oxidativo.** Respuestas relacionadas al estrés oxidativo en *M. quitense* expuesta durante 48 hs a diferentes concentraciones de Imidacloprid. Test utilizados: catalasa, glutathion S- transferasa, peróxido de hidrógeno y MDA ANOVA, guajacol peroxidasa Kruskal- Wallis. \*: diferencias significativas respecto al control negativo ( $p < 0,05$ ).

### **3.1.3.2. Bioensayo Tiempo- respuesta a 100 µg/L IMI.**

En este bioensayo la respuesta de los controles a 0, 12, 24 y 48 hs se mantuvo estable para GST, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y MDA ( $p > 0,05$ ), en tanto que CAT disminuyó su actividad a partir de las 12 hs ( $p < 0,05$ ) y POD lo hizo a partir de las 24 hs ( $p < 0,05$ , Figura 19). Al exponer las plantas a 100 µg/L IMI, la actividad de CAT y POD disminuyó a las 48 hs de exposición ( $p < 0,05$ ), en tanto que la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> subió a las 12 hs y decreció a las 48 hs ( $p < 0,05$ , Figura 19). Por otro lado, la actividad de GST así como las concentraciones de MDA no se modificaron en este bioensayo ante la exposición a IMI ( $p > 0,05$ , Figura 19).



**Figura 19. Curvas Tiempo- Respuesta *Myriophyllum quitense*. Estrés y Daño Oxidativo.** Respuestas relacionadas al estrés oxidativo en *M. quitense* expuesta durante a 100 µg/L imidacloprid a 12, 24 y 48 hs y a diferentes concentraciones de Imidacloprid. \*: diferencia significativa respecto al control negativo (test T de Student,  $p < 0,05$ ). Letras diferentes marcan diferencias significativas entre los controles (test de ANOVA,  $p < 0,05$ ).

### 3.2. Discusión

La mayor parte de los bioensayos ecotoxicológicos en organismos fotosintéticos acuáticos así como las guías desarrolladas para estandarizarlos toman como parámetro de toxicidad la inhibición del crecimiento tanto en microalgas como en macrófitas acuáticas (Lewis, 1995; Gopalapillai *et al.*, 2014). En la presente tesis se logró desarrollar una adaptación de la guía OECD 238 diseñada para el bioensayo con la macrófita *M. spicatum* utilizando la especie nativa sudamericana *M. quitense* expuesta a IMI. En este caso, se cuantificó no sólo el cambio en la longitud y la biomasa como parámetros de crecimiento, sino también las concentraciones de clorofilas A, B, clorofilas totales y su relación A/B. Estos pigmentos fotosintéticos también se cuantificaron complementariamente en bioensayos de exposición aguda de tipo concentración- (48 hs, 1, 10, 100, 1.000 y 10.000 µg/L IMI) y tiempo- respuesta (100 µg/L IMI, 12, 24 y 48 hs).

En general, no se encuentran disponibles en la literatura datos de toxicidad aguda de IMI en macrófitas acuáticas y respecto a otros taxones del reino vegetal existe poca información. La Base de Datos de Propiedades de Plaguicidas de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada no presenta datos de toxicidad de IMI en plantas acuáticas, aunque sí informa una concentración sin efectos observados (NOEC) de 10 mg/ L en el crecimiento del alga *Scenedesmus subspicatus* (IUPAC PPDB, 2017). En el alga unicelular *Chlamydomonas mexicana*, se ha informado que concentraciones entre 1 y 15 mg/L IMI incrementan su tasa de crecimiento junto a una disminución en el contenido de pigmentos, carbohidratos y proteínas, en tanto que concentraciones entre 20 y 25 mg/L inhiben su crecimiento (Kumar *et al.*, 2016). En la presente tesis, la exposición durante 14 días bajo condiciones

controladas a distintas concentraciones de IMI no produjo efectos significativos en el crecimiento de *M. quitense*, tanto en su peso como en longitud.

Estudios realizados en plantas de interés comercial han mostrado efectos tales como una disminución en el poder germinativo de las semillas, en la elongación de las raíces de la planta y en el crecimiento del tallo de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) expuestas a IMI durante 72 hs. (Shakir *et al.*, 2016). En el estudio citado, se informó también que la disminución del crecimiento de la planta estuvo acompañada de una disminución en la concentración de clorofilas A, B y carotenoides. Se han informado además, tanto para *L. esculentum* como para el pepino (*Cucumis sativus*), efectos subletales luego de una semana de exposición a IMI, observándose un crecimiento desordenado de la planta y clorosis en las hojas (Ebel *et al.*, 2000). También para *C. sativus*, se observó disminución de la tasa fotosintética y aumento en los niveles de CO<sub>2</sub> intercelular. En plantas de algodón se ha informado reducción del crecimiento luego de 7 días de exposición a IMI, pero la concentración de clorofilas totales como la de proteínas solubles no se vieron modificadas, aún a los 21 días de exposición (Preetha y Stanley, 2012). Para la caña de azúcar, la exposición a IMI asociada al estrés hídrico produjo disminución en el diámetro de la superficie foliar y del tallo, así como la masa de este último. Sin embargo esta disminución en el crecimiento no se relacionó con cambios en los pigmentos ni en la actividad fotosintética (Endres *et al.*, 2016). Es así como las respuestas de los organismos fotosintéticos ante la exposición a IMI informada en la bibliografía no presentan un patrón ecuánime.

La clorofila cumple un rol único y esencial en el proceso de fotosíntesis, por tener

la capacidad de captar la energía lumínica y transducirla (Eckhardt *et al.*, 2004). La cuantificación de clorofilas es una variable fisiológica muy plausible de modificarse en macrófitas acuáticas a partir de distintas interacciones con los componentes del ambiente (Brain y Cedergreen, 2009). Existen varios informes acerca de los factores que pueden desencadenar el proceso de senescencia, encontrándose entre ellos las altas temperaturas y la presencia de xenobióticos (Hegedüs *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2007). Pese a que no se observaron efectos en el crecimiento de *M. quitense* al cabo de 14 días, se observó un incremento de las concentraciones tanto de clorofila A como de clorofila B al exponer la especie a 20.000 µg/L IMI. Esta sensibilidad mayor de las clorofilas sobre los biomarcadores de crecimiento ya ha sido descrita con anterioridad en macrófitas (Brain y Cedergreen, 2009), e incluso se ha propuesto que la cuantificación de clorofilas debería ser parte del análisis de los ensayos de inhibición de crecimiento (Greenberg *et al.*, 1992). Gonias *et al.* (2008) postularon que IMI puede producir un aumento en el metabolismo de las plantas y en la actividad fotosintética. Esta podría ser una posible explicación de porqué estos pigmentos en *M. quitense* aumentaron a concentraciones altas de IMI en el agua. De cualquier modo, este efecto de aumento en las clorofilas se observó en una concentración muy alta comparada con las encontradas en distintos cuerpos de agua tal como se mencionó previamente (ver sección 1.4.).

A 100 µg/L IMI no se observó efecto luego de 12 o 24 hs ni en la concentración de clorofilas y su relación, ni en la actividad de enzimas antioxidantes. Si bien a las 12 hs se observó un aumento en la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, este hecho no se relacionó con respuestas enzimáticas ni con daño oxidativo en lípidos.



A concentraciones bajas de IMI (1 y 10 µg/L IMI) luego de 48 hs se produjo un descenso en las clorofilas A y totales, y en el caso de 10 µg/L IMI, las concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y MDA se incrementaron, evidenciando la condición oxidativa de las células. Este efecto también se ha demostrado para *M. quitense* expuesta al insecticida organoclorado endosulfán (Menone *et al.*, 2008) y a metales pesados (Nimptsch *et al.*, 2005). El descenso en la concentración de clorofila A podría relacionarse a este estrés y daño oxidativo, debido a que se ha informado que esta suele ser más sensible que la clorofila B (Kong *et al.*, 1999). Este efecto se observó a concentraciones de relevancia ambiental.

Los resultados obtenidos en los biomarcadores de *M. quitense* expuesta a 100 µg/L IMI durante 48 hs son contradictorios. Por un lado, al analizar el ensayo concentración- respuesta se observó un efecto en los pigmentos (disminución de la concentración de clorofilas A, B y total) y no se observó efecto en los biomarcadores de estrés oxidativo. Pero, por el otro, en el ensayo tiempo- respuesta las concentraciones de clorofilas no se modificaron pero hubo disminución de las actividades enzimáticas tanto de CAT y POD como en la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Esta falta de reproducibilidad le quita robustez al uso de estos biomarcadores. Lytle y Lytle (2001) postuló que este tipo de biomarcadores bioquímicos son prometedores como alarmas tempranas ante estresores ambientales, pero su relevancia ambiental debe estar asociada a otros parámetros como por ejemplo, los pigmentos.

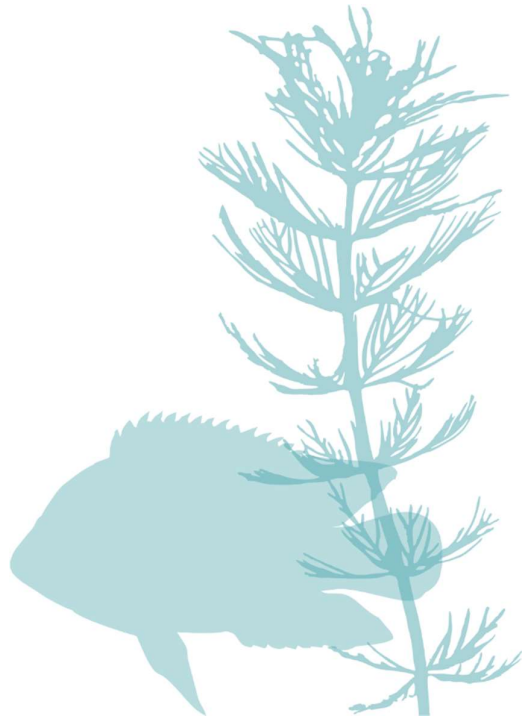
## Bibliografía:

- Brain RA y Cedergreen N. 2009. Biomarkers in Aquatic Plants: Selection and Utility. En: *Reviews of Environmental and Contamination Toxicology*, 198, 49- 109.
- Ebel RC, Wallace B y Elkins C. 2000. Phytotoxicity of the systemic insecticide imidacloprid on tomato and cucumber in the greenhouse. *HortTechnology*, 10(1), 144–147.
- Eckhardt U, Grimm B y Hörtensteiner S. 2004. Recent advances in chlorophyll biosynthesis and breakdown in higher plants. *Plant Molecular Biology*, 56(1), 1-14.
- Endres L, Oliveira NG, Ferreira VM, Silva JV, Barbosa GVS y Maia Junior SO. 2016. Morphological and physiological response of sugarcane under abiotic stress to neonicotinoid insecticides. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 28(4), 347–355.
- Gonias ED, Oosterhuis DM y Bibi AC. 2008. Physiologic Response of Cotton to the Insecticide Imidacloprid under High-Temperature Stress. *Journal of Plant Growth Regulators*, 27, 77–82.
- Gopalapillai Y, Vigneault B y Hale BA. 2014. Root length of aquatic plant, *Lemna minor* L., as an optimal toxicity endpoint for biomonitoring of mining effluents. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 10(4), 493–497.
- Greenberg BM, Huang XD y Dixon DG. 1992. Applications of the aquatic higher plant *Lemna gibba* for ecotoxicological assessment. *Journal of Aquatic Ecosystem Health*, 1, 147- 155.
- Hegedüs A, Erdei S y Horváth G. 2001. Comparative studies of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress. *Plant Science*, 160(6), 1085-1093.
- International Union of Pure and Applied Chemistry. PPDB: Pesticides Properties DataBase. University of Hertfordshire, Hatfield, Hertfordshire, UK. (consultado Mayo 2017). Disponible en: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/atoz.htm>
- Kong FX, Hu W, Chao SY, Sang WL y Wang LS. 1999. Physiological responses of the lichen *Xanthoparmelia mexicana* to oxidative stress of SO<sub>2</sub>. *Environmental and Experimental Botany*, 42, 201- 209.
- Kumar MS, Kabra AN, Min B, El-Dalatony MM, Xiong J, Thajuddin N, ... y Jeon BH. 2016. Insecticides induced biochemical changes in freshwater microalga *Chlamydomonas mexicana*. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(2), 1091–1099.
- Lewis MA. 1995. Use of freshwater plants for phytotoxicity testing: A review. *Environmental Pollution*, 87(3), 319–336.
- Lytle JS y Lytle TF. 2001. Use of plants for toxicity assessment of estuarine ecosystems. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(1), 68–83.
- Menone ML, Pesce SF, Díaz MP, Moreno VJ y Wunderlin DA. 2008. Endosulfan induces oxidative stress and changes on detoxication enzymes in the aquatic macrophyte *Myriophyllum quitense*. *Phytochemistry*, 69(5), 1150–1157.
- Nimptsch J, Wunderlin DA, Dollan A y Pflugmacher S. 2005. Antioxidant and biotransformation enzymes in *Myriophyllum quitense* as biomarkers of heavy metal exposure and eutrophication in

Suquía River basin (Córdoba, Argentina). *Chemosphere*, 61(2), 147–157.

- Preetha G y Stanley J. 2012. Influence of Neonicotinoid Insecticides on the Plant Growth Attributes of Cotton and Okra. *Journal of Plant Nutrition*, 35(8), 1234–1245.
- Shakir SK, Kanwal M, Murad W, Rehman Zu, Rehman Su, Daud MK y Azizullah A. 2016. Effect of some commonly used pesticides on seed germination, biomass production and photosynthetic pigments in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Ecotoxicology*, 25(2), 329–341.
- Zhao H, Dai T, Jing Q, Jiang D y Cao W. 2007. Leaf senescence and grain filling affected by post-anthesis high temperatures in two different wheat cultivars. *Plant Growth Regulation*, 51(2), 149-158.

## 4. Capítulo 2: Incorporación y distribución de imidacloprid en *Austroloheros facetus*.



A continuación se describirán los resultados provenientes del análisis de incorporación y distribución de IMI en distintos tejidos de *A. facetus*.

#### 4.1. Resultados.

##### 4.1.1. Concentración de IMI en el medio de exposición.

Las concentraciones nominales y medidas de IMI correspondientes a cada tiempo de exposición se presentan en la Tabla 7. Las concentraciones detectadas en el agua correspondieron al 91%, 119%, y 97% de las concentraciones nominales de 100 µg/L, 300 µg/L, y 2500 µg/L, respectivamente a tiempo 0 hs; mientras que a 24 hs correspondieron al 113%, 111% y 129% y a 48 hs se hallaron porcentajes de 147%, 134%, y 120%.

Concentración Nominal (µg/L)	Concentración medida (µg/L)		
	0 h	24 h	48 h
<b>100</b>	91,2 ± 17,6	113,2 ± 16,5	147,5 ± 33,0
<b>300</b>	357,5 ± 4,6	336,9 ± 104,4	403,2 ± 17,6
<b>2500</b>	2414,3 ± 327,5	3226,3 ± 399,0	3011,7 ± 216,3

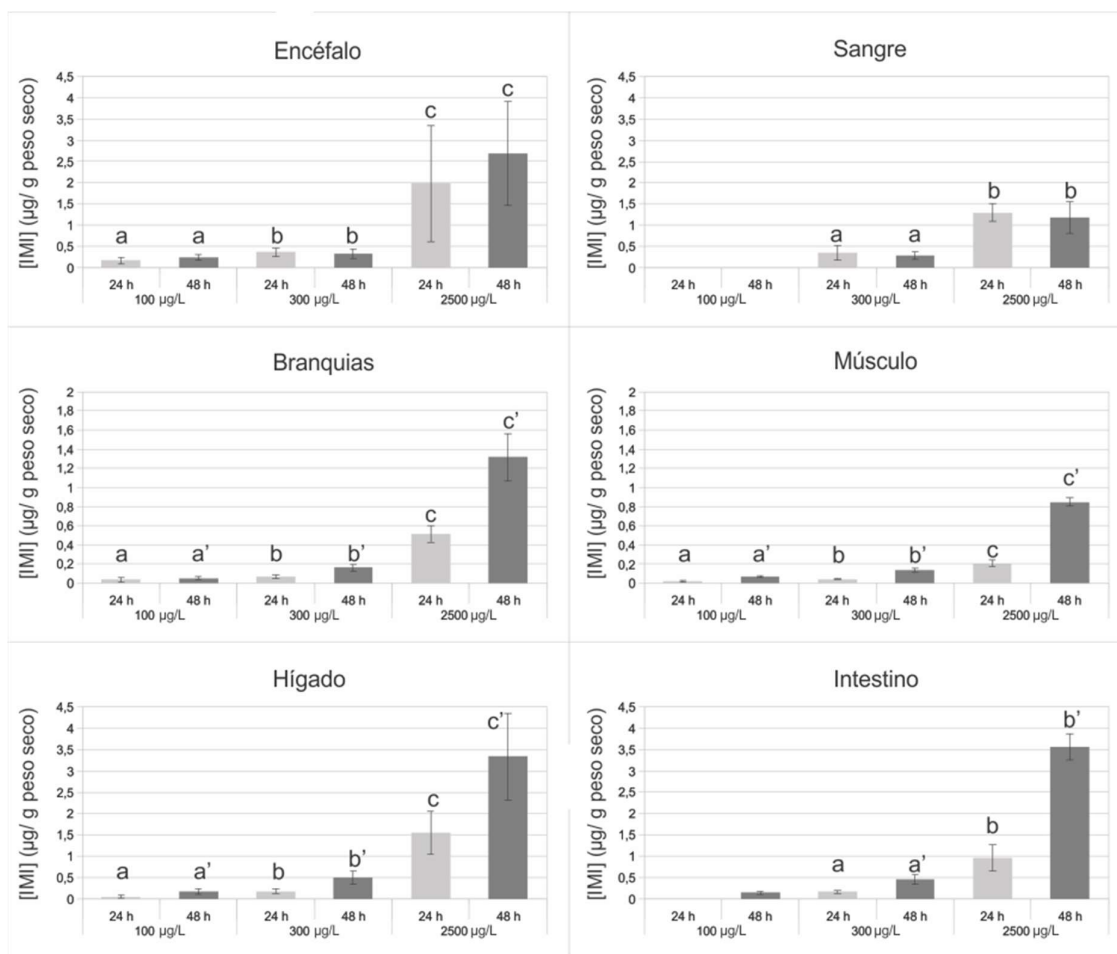
**Tabla 7: Concentración nominal y cuantificada (µg/ L) de imidacloprid en agua.** Se observan concentraciones a tiempo cero (0) y luego de 24 y 48 h desde iniciado el experimento. Los datos están expresados como media ± d.e.; n=3.

##### 4.1.2. Concentración de IMI en los tejidos de *A. facetus*.

Las concentraciones de IMI en encéfalo, músculo, branquias, intestino, hígado y sangre se muestran en la Figura 20.

La mayoría de los tejidos mostraron el mismo patrón de concentración: cuanto mayor fue el tiempo de exposición, mayor fue la concentración en los tejidos.

En hígado, branquias, intestino y músculo la concentración de IMI fue mayor a las 48 h que a las 24 h ( $p < 0,05$ ), mientras que en encéfalo y sangre los niveles de IMI fueron similares en ambos tiempos ( $p > 0,05$ ).



**Figura 20: Concentración de imidacloprid (µg/ g peso seco) en encéfalo, sangre, branquias, músculo, hígado e intestino de peces expuestos a 100, 300 y 2500 µg/ L por 24 y 48 h. Las diferentes letras indican diferencias entre concentraciones de exposición al mismo tiempo (test de ANOVA,  $p < 0,05$ ). a vs. a', b vs. b', c vs. c' indican diferencias significativas entre tiempos a la misma concentración de exposición (test T de Student,  $p < 0,05$ ).**

El IMI se detectó en encéfalo y branquias en todas las condiciones (tiempos y concentraciones) estudiadas. Para 24 y 48 hs de exposición, la concentración de IMI en encéfalo y branquias fue mayor a 2500 µg/L que a 300 µg/L, y mayor en este tratamiento que a 100 µg/L ( $p < 0,05$ ). En ambos tejidos se observó el mismo patrón de mayor concentración en el tejido a mayor concentración en el medio.

El compuesto no fue detectado en sangre de peces expuestos a 100 µg/L durante 24 y 48 hs. Sin embargo, sí fue detectado en las otras dos concentraciones, siendo mayor la concentración en sangre en peces expuestos a 2500 que a 300 µg/L ( $p <$

0,05).

El IMI fue detectado y cuantificado en todas las muestras de músculo, pero las concentraciones halladas fueron las más bajas entre todos los tejidos analizados. La concentración de IMI hallada en músculo fue dependiente de la concentración de exposición ( $p < 0,05$ ).

El IMI también se detectó en muestras de hígado, hallándose en este tejido una de las concentraciones más altas, siendo de 3,34  $\mu\text{g/g}$  peso seco, luego de 48 h de exposición. La concentración de IMI en hígado aumentó conforme aumento la concentración en el medio ( $p < 0,05$ ).

En intestino no se detectó IMI con una exposición a 100  $\mu\text{g/L}$  durante 24 h. Sin embargo, se detectaron las mayores concentraciones promedio (3,56  $\mu\text{g/g}$  peso seco) a 2500  $\mu\text{g/L}$  luego de 48 h de exposición.

#### **4.1.3. Factores de Bioconcentración.**

Los FBC fueron calculados en los seis tejidos para ambos tiempos de exposición y a las tres concentraciones ensayadas, excepto en intestino a 100  $\mu\text{g/L}$  y 24 hs y en sangre a 100  $\mu\text{g/L}$  para 24 y 48 hs de exposición, debido a que en esas condiciones de exposición las concentraciones de IMI estuvieron por debajo del límite de cuantificación.

Luego de 24 y 48 h, los FBC mostraron partición al agua, con valores cercanos a 1, indicando que no existió bioconcentración en *A. facetus* (Tabla 8).

Tratamiento		FBC por tejido					
		Hígado	Branquia	Encéfalo	Músculo	Intestino	Sangre
100 µg/L	24 h	0,5 ± 0,1	0,3 ± 0,2	1,4 ± 0,2	0,2 ± 0,1	n.c.	n.c.
	48 h	1,5 ± 0,6	0,4 ± 0,1	1,8 ± 0,7	0,6 ± 0,1	1,2 ± 0,2	n.c.
300 µg/L	24 h	0,5 ± 0,2	0,2 ± 0,0	1,0 ± 0,3	0,1 ± 0,0	0,5 ± 0,1	0,9 ± 0,5
	48 h	1,4 ± 0,4	0,4 ± 0,1	0,9 ± 0,3	0,4 ± 0,1	1,3 ± 0,3	0,6 ± 0,4
2500 µg/L	24 h	0,4 ± 0,3	0,2 ± 0,0	0,7 ± 0,5	0,1 ± 0,0	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,2
	48 h	1,2 ± 0,4	0,5 ± 0,1	0,9 ± 0,4	0,3 ± 0,0	1,0 ± 0,6	0,4 ± 0,1

**Tabla 8: Factores de Bioconcentración (FBC) en tejidos de *Australoheros facetus* expuesto a imidacloprid.** Se observan los FBC de peces expuestos a 100, 300 and 2500 µg/ L de imidacloprid por 24 y 48 hs. Los datos están expresados como media ± d.e. en L/ kg; n.c: no calculado; n=5.

## 4.2. Discusión.

El método utilizado para la extracción de IMI mostró ser efectivo para su identificación en diferentes tejidos del pez *A. facetus* permitiendo cuantificar todas las concentraciones y a todos los tiempos ensayados, excepto para las muestras de sangre a la concentración más baja (100 µg/ L IMI) y en el intestino a la misma concentración pero sólo en el período de 24 h. El aumento pequeño observado en la concentración de IMI medida en el agua respecto de la concentración nominal conforme transcurrió el tiempo de ensayo, pudo ser producto de evaporación del agua, produciendo un efecto de concentración.

Numerosos factores primarios incluyendo la liposolubilidad del compuesto controlan la distribución de xenobióticos desde la sangre a los tejidos periféricos (Di Giulio y Hinton, 2008). Los compuestos químicos orgánicos con bioacumulación y persistencia ambiental elevadas han sido usualmente monitoreados por muchos años. Sin embargo, en la actualidad se están utilizando plaguicidas orgánicos menos persistentes y menos hidrofóbicos que los tradicionales (por ejemplo, los organoclorados). Más allá de su potencial de bioconcentración menor, grandes cantidades de algunos de estos compuestos son volcados a los ecosistemas



acuáticos pudiendo causar toxicidad y/o inducir anomalías subletales crónicas (Álvarez *et al.*, 2007). En *A. facetus*, los FBC para IMI fueron bajos, dado su carácter hidrofílico ( $\log K_{ow} = 0,57$ , IUPAC, PPDB). No se observó bioconcentración neta salvo en el encéfalo a  $100 \mu\text{g/L}$  IMI (llegando a un FBC de 1,8 a las 48 h) y en hígado luego de 48 h a todas las concentraciones ensayadas. Pese a que la afinidad del IMI con los receptores nicotínicos de vertebrados es menor que en invertebrados, no se puede descartar que la bioacumulación en estas condiciones se deba a la unión del compuesto en los receptores del pez (Tomizawa y Casida, 2005).

Aunque muy posiblemente no se haya alcanzado la condición de equilibrio entre incorporación y eliminación del IMI a las 48 hs, los FBCs son de utilidad no sólo para comprobar si los tejidos del pez fueron capaces de concentrar niveles altos de IMI del agua sino para comprender si la concentración de IMI en el medio afectaba su tasa de incorporación en el pez. Debido a que las concentraciones utilizadas en este ensayo fueron relativamente altas comparadas con los niveles comúnmente encontrados en cuerpos de agua, y a los valores de FBC obtenidos (en general fueron  $<1$ ), los resultados sugieren que los peces en su ambiente natural no presentarán concentraciones de IMI en sus tejidos mayores a las presentes en el cuerpo de agua que habitan. Sin embargo, la utilización de formulados comerciales podría aumentar la tasa de acumulación hallada en la presente tesis, en la cual se utilizó el ingrediente activo individual. Este hecho podría esperarse debido a la presencia de coadyuvantes (por ejemplo dimetilsulfóxido, metil-pirrolidona, etc.) en los formulados, los cuales pueden modificar la biodisponibilidad del compuesto (Feng *et al.*, 2004), haciéndolo más biodisponible.

El hecho de que el IMI haya sido encontrado en el encéfalo, independientemente de su concentración en el medio de exposición, indica que pudo atravesar la barrera hemato-encefálica, que es una estructura esencial para mantener la homeostasis del

órgano y protegerlo de sustancias tóxicas (Jeong *et al.*, 2008). En general, mientras más hidrofílico sea el compuesto, menos probable es que el mismo supere la barrera hemato-encefálica. Sin embargo, algunos compuestos hidrofílicos pueden superarla a través de transportadores presentes en la misma (Di Giulio y Hinton, 2008). La presencia de IMI observada en el tejido encefálico, sugiere que posiblemente pueda causar efectos negativos en el sistema nervioso central de *A. facetus*. Además, el cerebro suele tener una menor defensa contra posibles efectos tóxicos, por ejemplo, los causados por estrés oxidativo (Mates, 2000; Song *et al.*, 2006). El principal efecto del IMI en los tejidos encefálicos está relacionado a su modo de acción específico como agonista neurotóxico, por activación de receptores nicotínicos, el cual ha sido poco estudiado en vertebrados en general y mucho menos en peces. En humanos, se han informado problemas asociados con los neonicotinoides como la falta de memoria a corto plazo, así como el "desorden de acomodación" de la vista y temblores de manos (Taira, 2014).

De manera similar al encéfalo, el aumento de la concentración de IMI en la sangre no fue directamente proporcional al incremento de la concentración de IMI en el medio de exposición. Una vez que el compuesto ingresa al organismo, su principal mecanismo de distribución es a través del sistema circulatorio (Connell, 2005). De acuerdo a los resultados de esta tesis, el IMI es inmediatamente distribuido a otros tejidos vía sistema circulatorio, pero su presencia en sangre puede acarrear posibles efectos en sus componentes. Pese a que no hay datos disponibles en la literatura respecto a efectos de insecticidas neonicotinoides sobre los componentes de la sangre de peces, se ha demostrado que otros tipos de plaguicidas como los organofosforados (Hii *et al.*, 2007) y los organoclorados (Tierney *et al.*, 2013) son causantes de efectos negativos en eritrocitos y leucocitos, así como en los niveles de hemoglobina.

Los FBC en branquias no se modificaron con la concentración de IMI en el medio de exposición. Debido a que los compuestos hidrofílicos (como por ejemplo el IMI) se encuentran en solución de inmediato en el agua, los mismos están disponibles fácilmente al epitelio de las branquias (Tierney *et al.*, 2013). La combinación de los siguientes factores: el intercambio de contracorriente entre el agua y la sangre, la amplia superficie de absorción (laminillas secundarias), y la distancia pequeña de difusión que separa el agua y la sangre, hace que la branquia sea altamente eficiente en la extracción de por ejemplo, pequeñas concentraciones de oxígeno presentes en el agua (Di Giulio y Hinton, 2008). Pero estas características se tornan negativas debido a que se puede producir el ingreso de compuestos potencialmente nocivos, como es el IMI disuelto en agua. Por otro lado, debido a que las branquias son el principal sitio de intercambio de gases, regulación hidromineral y excreción de nitrógeno del pez (Di Giulio y Hinton, 2008), resultarían de suma importancia los posibles efectos negativos sobre este tejido. En el pez arroz (*Oryzias latipes*) expuesto a IMI se detectó el "síndrome de estrés", caracterizado por un aumento en el metabolismo anaeróbico y un aumento en las concentraciones de ácido láctico, seguido por una infección parasitaria masiva (Sanchez- Bayo y Goka, 2005).

A causa de la naturaleza hidrofílica del IMI, en esta tesis se hipotetiza que la principal vía de ingreso del mismo al músculo es la irrigación sanguínea por sobre otras vías, como por ejemplo la incorporación a través de la piel desde el medio acuoso. Debido a que el músculo generalmente es el tejido comestible de los peces, la detección de IMI en este tejido luego de sólo 24 hs de exposición (en este caso particular *A. facetus*) alerta acerca de la importancia de evaluar su presencia en peces de agua dulce de importancia comercial.

Pese a que los ejemplares de *A. facetus* se mantuvieron en ayuno durante el ensayo, el tracto digestivo parece ser el destino más importante en el organismo para el IMI,

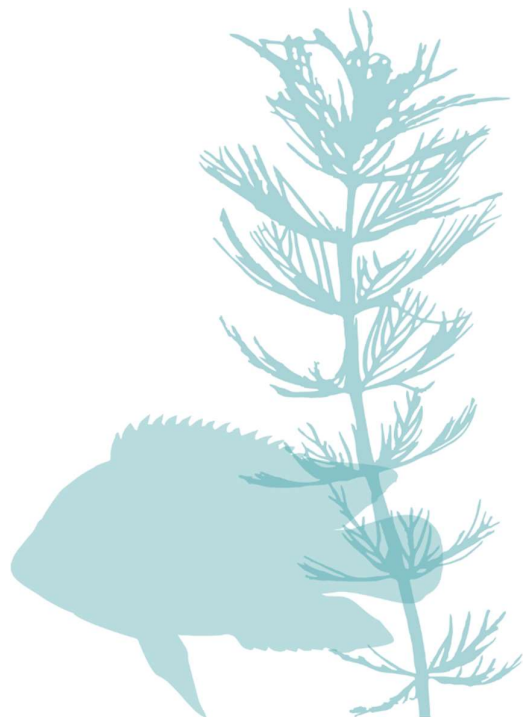
debido a que este tejido mostró las concentraciones más altas del insecticida en las muestras evaluadas. De hecho, el intestino es uno de los principales blancos de los agentes tóxicos, y dada su importante función osmoregulatoria, esto puede provocar efectos negativos en la regulación del balance hídrico e iónico (Di Giulio y Hinton, 2008). Los peces de agua dulce tienen bajas tasas de ingestión activa de agua por vía digestiva de agua, aunque al ser hipertónicos respecto al medio circundante la misma ingresa por diferentes vías. Los resultados obtenidos demuestran que la vía digestiva debe ser tomada en cuenta en ensayos toxicológicos con compuestos hidrofílicos, aún en condiciones de ayuno de los peces. En la presente tesis, la presencia de IMI en el intestino se pudo deber a la ingestión del IMI desde el medio de exposición, sumado a la abundancia de receptores nicotínicos de acetilcolina en el tracto intestinal (Taira, 2014).

Dado el sistema enzimático presente en el hígado y sus dos sistemas de provisión sanguínea (circulación general y enterohepática), este órgano es el blanco principal para los agentes xenobióticos cualquiera sea la ruta de exposición considerada (Di Giulio y Hinton, 2008). De hecho, el hígado de *A. facetus* fue también un tejido blanco para IMI, presentando una relación positiva entre las concentraciones en el medio y las presentes en el órgano. Por otro lado, la concentración de IMI en hígado aumentó en un factor  $>2$  desde las 24 a las 48 h de exposición. Pese a que no existían datos concernientes a efectos tóxicos de IMI sobre hígado de peces previos a esta tesis, se han informado procesos de estrés oxidativo e inflamación en hígado de ratas por exposición a IMI (Duzguner y Erdogan, 2010; Toor *et al.*, 2013).

## Bibliografía:

- Alvarez DA, Huckins JN, Petty JD, Jones-Lepp T, Stuer-Lauridsen F, Getting DT, Goddard JP y Gravell A. 2007. Tool for monitoring hydrophilic contaminants in water: Polar organic chemical integrative sampler (POCIS). En Greenwood R, Mills G, Vrana B. *Passive Sampling Techniques in Environmental Monitoring*, Vol 48- Comprehensive Analytical Chemistry. Elsevier, Amsterdam, Holanda, 486 pp.
- Connell DW. 2005. CRC Press. Taylor & Francis Group. Boca Raton, FL, USA. 468 pp.
- Di Giulio RT y Hinton DE. 2008. *The toxicology of fishes*. CRC Press Taylor & Francis Group. Boca Raton, FL, USA. 1071 pp.
- Duzguner V y Erdogan S. 2010. Acute oxidant and inflammatory effects of imidacloprid on the mammalian central nervous system and liver in rats. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 97, 13–18.
- Feng S, Kong Z, Wang X, Zhao L y Peng P. 2004. Acute toxicity and genotoxicity of two novel pesticides on amphibian Rana N. Hallowell. *Chemosphere* 56, 457–463.
- Hii YS, Lee MY y Chuah TS. 2007. Acute toxicity of organochlorine insecticide endosulfan and its effect on behaviour and some hematological parameters of Asian swamp eel (*Monopterus albus*, Zuiew). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 89, 46–53.
- International Union of Pure and Applied Chemistry. PPDB: Pesticides Properties DataBase. University of Hertfordshire, Hatfield, Hertfordshire, UK. (consultado Mayo 2017). Disponible en: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/atoz.htm>
- Jeong JY, Kwon HB, Ahna JC, Kangb D, Kwon SH, Park JA y Kim KW. 2008. Functional and developmental analysis of the blood–brain barrier in zebrafish. *Brain Research Bulletin* 75, 619–628.
- Mates JM. 2000. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* 153, 83–104.
- Sanchez Bayo F y Goka K. 2005. Unexpected effects of zinc pyrethrin and imidacloprid on Japanese medaka fish (*Oryzias latipes*). *Aquatic Toxicology* 74, 285–293.
- Song SB, Xu Y y Zhou BS. 2006. Effects of hexachlorobenzene on antioxidant status of liver and brain of common carp (*Cyprinus carpio*). *Chemosphere* 65, 699–706.
- Taira T. 2014. Human neonicotinoids exposure in Japan. *Japan Journal of Clinical Ecology* 23, 14–24.
- Tierney KB, Kennedy CJ, Gobas F, Gledhill M y Sekela M. 2013. Organic contaminants and fish. En Tierney KB, Farrell AP, Brauner CJ, eds, *Organic Chemical Toxicology of Fishes*, Vol 33- Fish Physiology. Academic, London, UK, 574 pp.
- Tomizawa M y Casida JE. 2005. Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. *Annual Reviews in Pharmacology and Toxicology*. 45, 247– 68
- Toor HK, Sangha GK y Khera KS. 2013. Imidacloprid induced histological and biochemical alterations in liver of female albino rats. *Pesticide, Biochemistry and Physiology* 105, 1– 4.

**5. Capítulo 3: Biomarcadores de estrés oxidativo  
en *Australoheros facetus* expuestos a  
imidacloprid**



**A continuación se describirán los resultados provenientes del análisis de biomarcadores de estrés oxidativo en *A. facetus* expuestos a IMI, tanto de los ensayos concentración- y tiempo- respuesta.**

## **5.1. Resultados.**

### **5.1.1. Bioensayo concentración- respuesta *A. facetus*. Estrés oxidativo.**

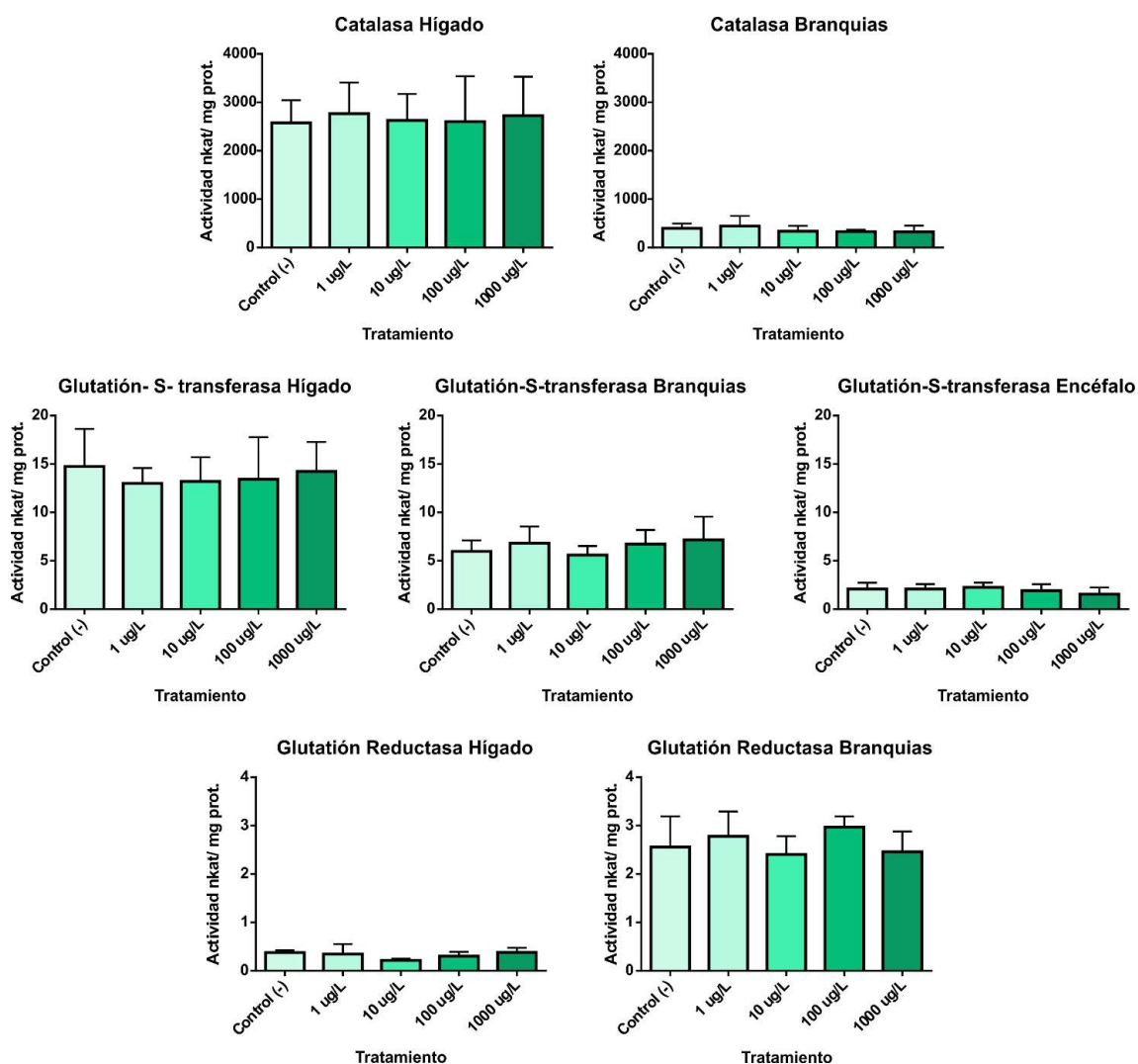
En el bioensayo realizado utilizando diferentes concentraciones del IMI durante 48 hs no se observó mortalidad de los especímenes de *A. facetus* ni síntomas macroscópicos de toxicidad.

La actividad de las enzimas antioxidantes en los organismos control mostraron diferencias en su actividad dependiendo del tejido evaluado. Es así que la actividad de CAT fue mayor en hígado que en branquias ( $p < 0,05$ ; test de Mann- Whitney). De manera similar la actividad de GST fue mayor en hígado que en branquias, y en este tejido aún mayor que en encéfalo ( $p < 0,05$ ; test de Kruskal- Wallis y test de Dunn). Contrariamente a este patrón, la enzima GR mostró mayor actividad en las branquias que en el hígado ( $p < 0,05$ ; test de Mann- Whitney). La actividad de SOD fue mayor en hígado y en encéfalo que en branquias ( $p < 0,05$ ), y similar entre los dos primeros ( $p > 0,05$ ; test de Kruskal- Wallis y test de Dunn), mientras que las concentraciones de  $H_2O_2$  en hígado fueron mayores que en branquias ( $p < 0,05$ ), y similares entre hígado y encéfalo por un lado, y branquia y encéfalo por otro ( $p > 0,05$ ; test de Kruskal- Wallis y test de Dunn). La peroxidación lipídica y la oxidación de proteínas presentaron concentraciones similares al comparar entre tejidos ( $p > 0,05$ ; test de ANOVA y test de Tuckey).

La actividad de las enzimas CAT y GR en encéfalo no fueron posibles de cuantificar en las muestras de *A. facetus* mediante la técnica empleada debido a la muy baja actividad de estas enzimas en estos tejidos.

Las actividades de CAT, GST y GR no mostraron diferencias significativas en los tejidos

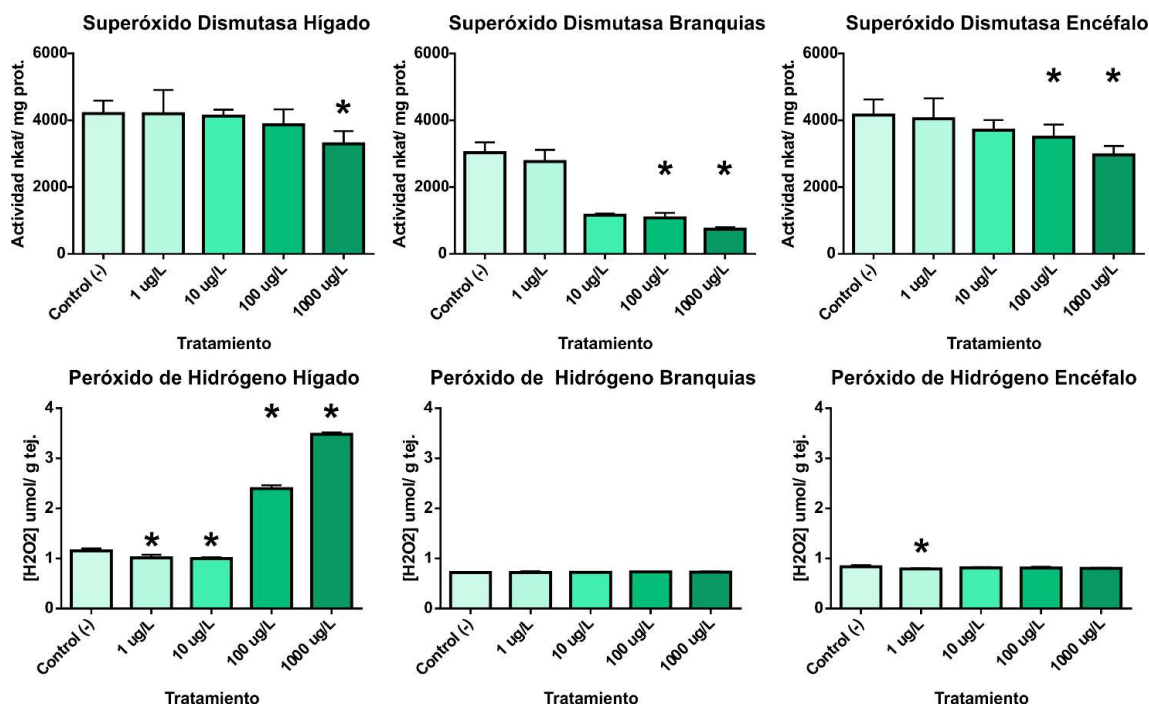
evaluados cuando los peces fueron expuestos a 1, 10, 100 y 1000  $\mu\text{g/L}$  IMI ( $p > 0,05$ , Figura 21). La actividad de SOD disminuyó a 1000  $\mu\text{g/L}$  IMI en hígado y a 100 y 1000  $\mu\text{g/L}$  en branquias y encéfalo ( $p < 0,05$ , Figura 22). Las concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  disminuyeron a 1 y 10  $\mu\text{g/L}$  IMI en el hígado, y aumentaron a 100 y 1000  $\mu\text{g/L}$  ( $p < 0,05$ ), mientras que estas concentraciones no se diferenciaron respecto al control en las branquias ( $p > 0,05$ ) y disminuyeron en encéfalo al exponer los peces a 1  $\mu\text{g/L}$  ( $p < 0,05$ , Figura 22).



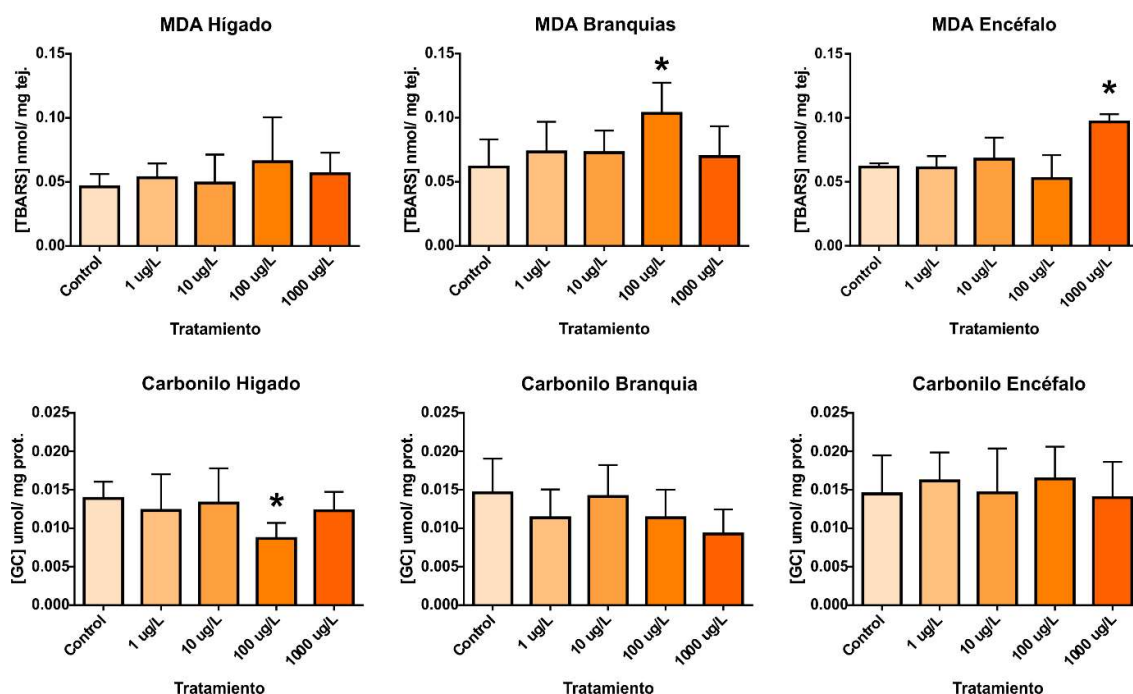
**Figura 21: Curvas Concentración- Respuesta *Australoheros facetus*. Catalasa, glutación- S- transferasas y glutación reductasa.** Actividades enzimáticas de catalasa, glutación- S- transferasa y glutación reductasa en hígado, branquias y encéfalo de *Australoheros facetus* expuesto a diferentes concentraciones de imidacloprid durante 48 hs.  $p > 0,05$ , test de ANOVA/ Dunnett para catalasa en hígado y glutación- S- transferasa en hígado y encéfalo, test de Kruskal Wallis/ Dunn para catalasa y glutación- S- transferasas en branquias y glutación reductasa en hígado y branquias.



Respecto a los biomarcadores de daño oxidativo, las concentraciones de MDA (peroxidación lipídica) se incrementaron a 100  $\mu\text{g/L}$  IMI y 1000  $\mu\text{g/L}$  IMI en branquias y encéfalo luego de 48 hs de exposición ( $p < 0,05$ , Figura 23). Sin embargo, no se detectó oxidación de proteínas, como se puede observar en las concentraciones de GC en los tres tejidos ( $p > 0,05$ , Figura 23).



**Figura 22: Curvas Concentración- Respuesta *Australoheros facetus*. Superóxido dismutasa y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** Actividad de la enzima superóxido dismutasa y concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en hígado, branquias y encéfalo de *Australoheros facetus* expuesto a diferentes concentraciones de imidacloprid durante 48 hs. \*: diferencias significativas respecto al control,  $p < 0,05$ . Test de ANOVA/ Dunnett para superóxido dismutasa en hígado y encéfalo y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en hígado y branquias, test de Kruskal- Wallis/ Dunn para superóxido dismutasa en branquias y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en encéfalo.



**Figura 23: Curvas Concentración- Respuesta *Australoheros facetus*. MDA y grupos Carbonilo.** Concentraciones de MDA y grupos carbonilo en hígado, branquias y encéfalo de *Australoheros facetus* expuesto a diferentes concentraciones de imidacloprid durante 48 hs. \*: diferencias significativas respecto al control,  $p < 0,05$ . Test de ANOVA/ Dunnett.

### 5.1.2. Bioensayo tiempo- respuesta *A. facetus*. Estrés oxidativo.

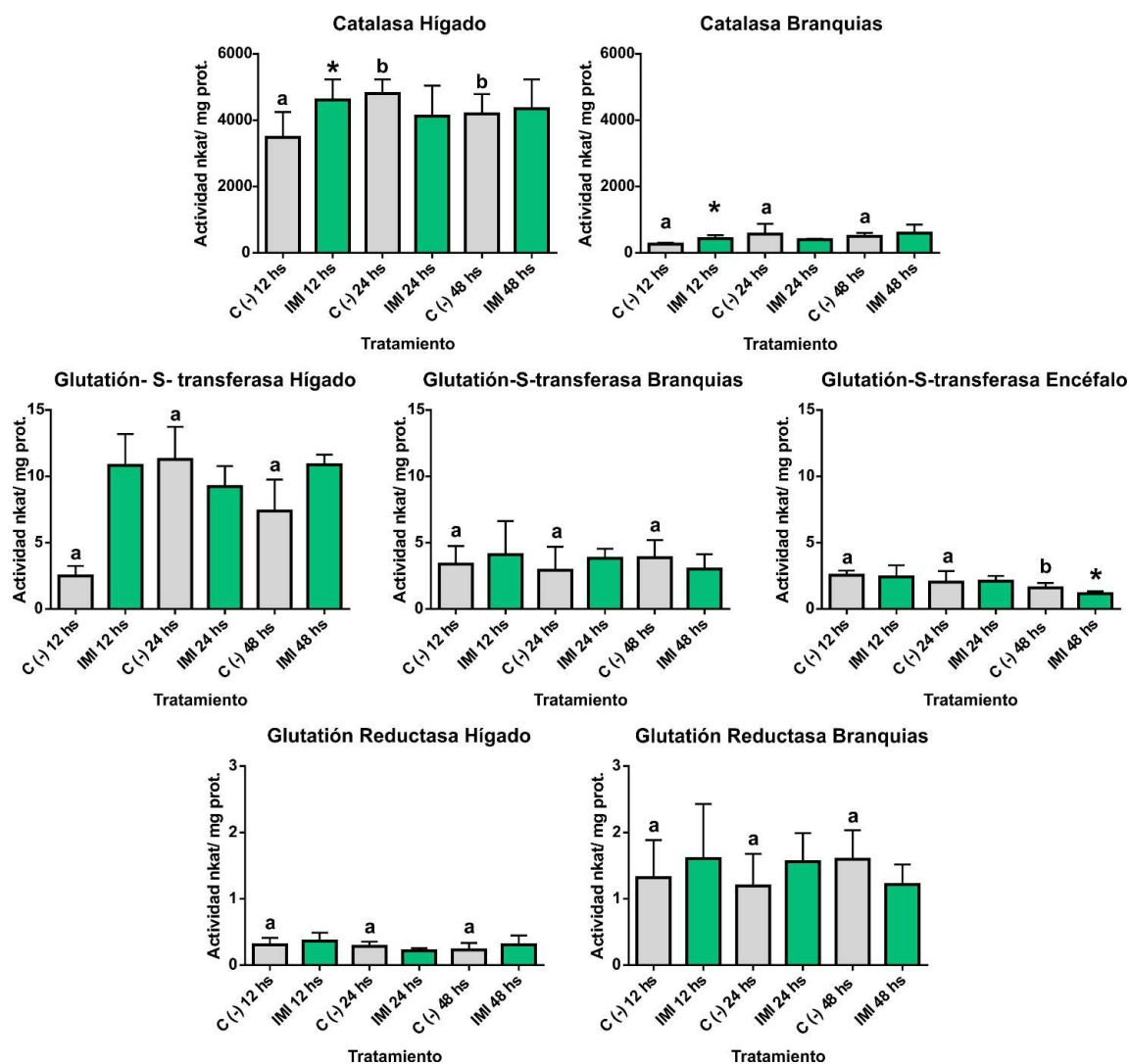
Al igual que en el bioensayo de concentración- respuesta, en el bioensayo de tiempo- respuesta no hubo mortalidad en los especímenes de *A. facetus* ni evidencias macroscópicas de toxicidad.

En este bioensayo al igual que en el anterior, se observaron diferencias en las actividades enzimáticas entre los distintos tejidos, tanto en CAT, GR ( $p < 0,05$ , test de Mann- Whitney), GST y SOD ( $p < 0,05$ , test de Kruskal- Wallis/ Dunn), como en las concentraciones de  $H_2O_2$  ( $p < 0,05$ , test de Kruskal- Wallis/ Dunn). No solo se presentaron diferencias entre tejidos, sino entre distintos tiempos. La estabilidad de las actividades enzimáticas y los niveles de  $H_2O_2$  en los controles a lo largo de los tres tiempos (12, 24 y 48 h), mostraron resultados diversos dependiendo del biomarcador y del tejido. Es así que la actividad de CAT en hígado fue menor a las 12 h que a las 24 h ( $p < 0,05$ ), sin embargo la actividad de CAT en branquias fue igual a los tres tiempos ( $p > 0,05$ , Figura 24). La actividad de la

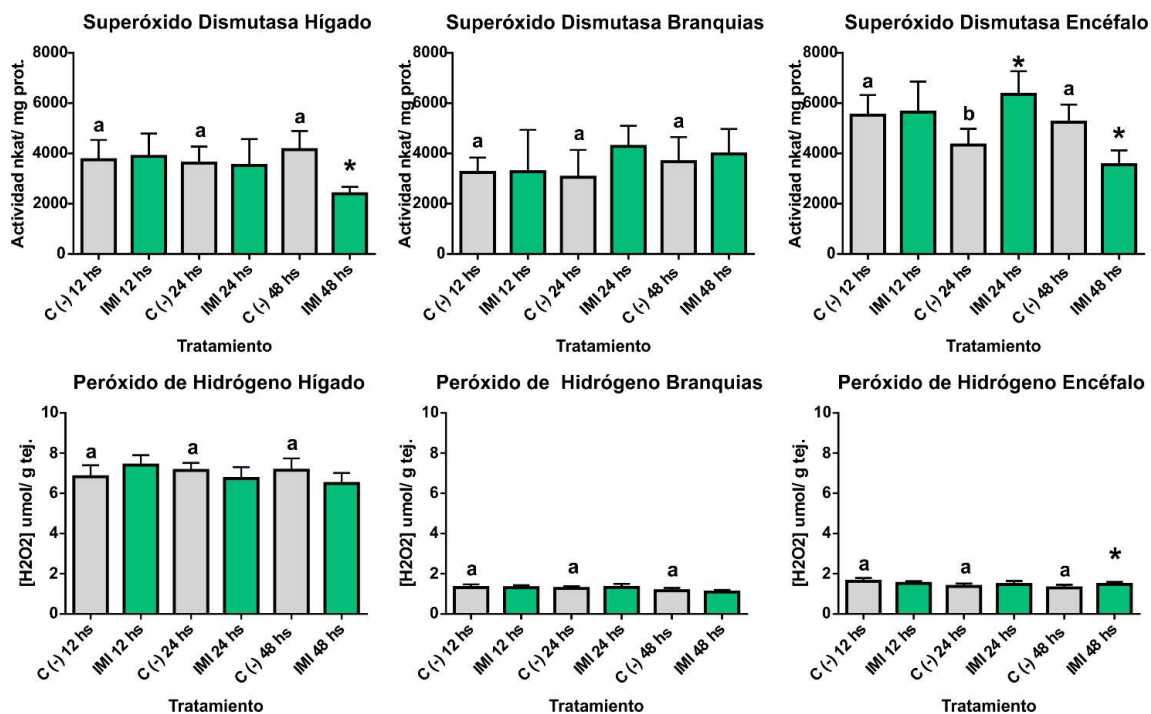
enzima GST fue igual a los tres tiempos en hígado y branquias ( $p > 0,05$ ), mientras que en cerebro fue menor a las 48 h respecto a las 12 h ( $p < 0,05$ , Figura 24). La enzima GR mostró actividades similares en los controles a los tres tiempos, tanto en hígado como en branquias ( $p > 0,05$ , Figura 24). La actividad de SOD fue similar a las 12, 24 y 48 hs, tanto en hígado como en branquias ( $p > 0,05$ , Figura 25). Por otro lado, la actividad de SOD disminuyó a las 24 h respecto a las 12 h en los controles ( $p < 0,05$ , Figura 25). Las concentraciones de  $H_2O_2$  no se modificaron en los controles en ninguno de los tres tiempos en hígado, branquia y cerebro ( $p > 0,05$ , Figura 25).

La actividad de CAT aumentó tanto en hígado como en branquias a las 12 hs de exposición a 100  $\mu\text{g/L}$  IMI ( $p < 0,05$ , Figura 24), mientras que las actividades de GST y GR no mostraron diferencias significativas en ninguno de los tejidos ni tiempos evaluados ante una exposición a 100  $\mu\text{g/L}$  IMI ( $p > 0,05$ , Figura 24).

En este bioensayo tiempo- respuesta, la actividad de SOD en encéfalo aumentó a las 24 hs de exposición a 100  $\mu\text{g/L}$  IMI y disminuyó tanto en encéfalo como en hígado a las 48 hs ( $p < 0,05$ , Figura 25). En las branquias no se observaron diferencias entre exposición al IMI y controles, a ninguno de los tiempos de exposición ( $p > 0,05$ ). Por otra parte, las concentraciones de  $H_2O_2$  en hígado y branquias no evidenciaron cambios ante la exposición al IMI ( $p > 0,05$ ), mientras que a las 48 h el  $H_2O_2$  aumentó en encéfalo ( $p < 0,05$ , Figura 25).



**Figura 24: Curvas Tiempo- Respuesta *Australoheros facetus*. Catalasa, glutación- S- transferasas y glutación reductasa.** Actividad de las enzimas catalasa, glutación s- transferasa y glutación reductasa en hígado, branquias y encéfalo de *Australoheros facetus* expuesto durante 12. 24 y 48 h a 100 µg/L de Imidacloprid. \*: diferencias significativas respecto a su control ( $p < 0,05$ , test T de Student). Letras diferentes marcan diferencias significativas entre los controles ( $p < 0,05$ , test de ANOVA/ Tuckey).



**Figura 25: Curvas Tiempo- Respuesta *Australoheros facetus*. Superóxido dismutasa y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

Actividad de superóxido dismutasa y concentraciones de peróxido de hidrógeno en hígado, branquias y encéfalo de *Australoheros facetus* expuesto durante 12, 24 y 48 h a 100 µg/L de Imidacloprid. \*: diferencia significativa respecto a su control ( $p < 0,05$ , test T de Student). Letras diferentes marcan diferencias significativas entre los controles ( $p < 0,05$ , test de ANOVA/ Tuckey).

## 5.2. Discusión

En la bibliografía existe poca información respecto a la toxicidad del IMI en peces. En general, se suele informar la concentración a la que el 50 % de los individuos expuestos muere luego de 96 hs de exposición ( $CL_{50}$ ). Este valor de toxicidad aguda, así como los LOEC a 7 y 14 días están en el orden de los mg/ L o g/ L con concentraciones que inducen mortalidad similar entre diferentes especies (Anderson *et al.*, 2015). En embriones del pez cebra (*Danio rerio*) expuestos al ingrediente activo IMI, no se observaron efectos tóxicos, pero sin embargo la exposición al formulado comercial de IMI “Confidor SL 200” causó mayor toxicidad en adultos de esa especie que en embriones (Tisler *et al.*, 2009). En cultivos celulares de branquias del lenguado asiático *Paralichthys olivaceus* se ha ensayado la citotoxicidad del IMI, encontrándose efectos en concentraciones entre 38,5 y 41,9 mg/L (Su *et al.*, 2007), mientras que en otras especies como la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y la carpa común (*Cyprinus carpio*) se ha observado una  $CL_{50}$  de 211 y 280 mg/L, respectivamente (Tisler *et al.*, 2009). En trabajos previos del grupo Ecotoxicología se observó una letalidad del 100 % al exponer a *A. facetus* al formulado comercial de IMI “Imida Nova 35” (Nova) durante 24 hs, a una concentración de un orden de magnitud menor (10 mg/ L IMI) (Iturburu *et al.*, 2017).

Los especímenes de *A. facetus* de los grupos C(-) mostraron diferencias significativas entre tejidos en los valores basales de todos los biomarcadores de exposición relacionados al estrés oxidativo (CAT, GST, GR, SOD,  $H_2O_2$ ). Este hecho se comprobó en ambos bioensayos con *A. facetus*, tanto concentración- como tiempo- respuesta. Además, en la literatura también existen ejemplos de estas diferencias basales entre tejidos de otras especies de peces, como en la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) o en la carpa común (*Cyprinus carpio*; Prieto *et al.*, 2006; Ozcan Oruc *et al.*, 2004). En particular para esta tesis, las respuestas basales más altas se observaron en hígado (excepto la actividad de GR), hecho que confirma la importancia del hígado como principal órgano de

detoxificación en los peces, tal como se ha demostrado previamente (Connell, 2005; Monteiro *et al.*, 2006).

Por otro lado, más allá de las diferencias basales entre tejidos, en *A. facetus* se observaron distintas respuestas a la exposición al IMI dependiendo del tejido evaluado. Este tipo de respuestas tejido- dependiente se ha descripto previamente en diferentes especies de peces expuestas a diversos estresores físicos y químicos (Madeira *et al.*, 2016; Ozcan Oruc y Usta, 2007), como por ejemplo las respuestas de la tilapia del Nilo al cadmio (Almeida *et al.*, 2002) o las de la carpa común al organoclorado hexaclorobenceno (Song *et al.*, 2006).

Para los biomarcadores de daño oxidativo (MDA y GC), no hubo diferencias significativas entre los controles de los tres tejidos. En el mugílido *Lisa aurata* se ha observado que en condiciones controladas de laboratorio las concentraciones basales de MDA en diferentes tejidos fueron similares (Oliveira *et al.*, 2008). Pero, al igual que en la presente tesis, los autores encontraron un incremento de la concentración de MDA en sólo algunos tejidos ante la exposición a un xenobiótico.

Entre los valores de los biomarcadores de estrés oxidativo de los organismos control a diferentes tiempos de ensayo, se pudo observar que la actividad de GR y la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no se modificaron con el transcurso del tiempo. Por otro lado, CAT, GST y SOD modificaron su actividad en al menos uno de los tejidos evaluados durante el tiempo de ensayo.

Las actividades enzimáticas de GST y GR no mostraron diferencias cuando los peces fueron expuestos a diferentes concentraciones de IMI durante 12, 24 y 48 hs sugiriendo que la conjugación con GSH no es una vía de detoxificación para IMI en peces. Mientras que Casida (2011) ha descripto que el glutatión puede estar involucrado en el metabolismo de fase II de IMI en ratones y plantas de espinaca, el metabolismo de IMI en peces no ha sido suficientemente estudiado.

La enzima CAT, junto a SOD, son los principales mecanismos detoxificadores de ERO (Mourente *et al.*, 2002). En particular CAT suele encontrarse en peroxisomas y junto a GPx son las encargadas de detoxificar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Davies, 2000). Al exponer al cíclido *A. facetus* a IMI en el ensayo concentración- respuesta se observó que la enzima CAT no modificó su actividad a las 48 hs. Sin embargo, el ensayo tiempo- respuesta mostró que esta enzima respondió a un tiempo menor de exposición (12 hs), tanto en hígado como en branquias, incrementando su actividad ante la exposición a 100 µg/L IMI. Este aumento de actividad se pudo haber desencadenado por un aumento en la concentración de ERO. La disminución posterior de la actividad de CAT que mostró valores similares a los valores basales, así como el incremento de los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en hígado y MDA en branquias posteriores, destacan la actividad de CAT como primera defensa ante el estrés oxidativo, si bien esta actividad de CAT no fue suficiente para evitar el estrés y posterior daño oxidativo en *A. facetus*.

La peroxidación lipídica es uno de los efectos de la acción tóxica de contaminantes ambientales, que conduce a la pérdida de función celular bajo condiciones de estrés oxidativo (Del Rio *et al.*, 2005). Las membranas fosfolipídicas peroxidadas se vuelven más rígidas y pierden su permeabilidad e integridad, siendo un mecanismo disparador de muchas condiciones patológicas en diferentes organismos (Valavanidis *et al.*, 2006). En la presente tesis se observó peroxidación lipídica en *A. facetus* a altas concentraciones de IMI en branquias y encéfalo (100 y 1000 µg/L IMI, respectivamente), pero los niveles de MDA no se relacionaron con la actividad de GST, es decir, que este daño no fue regulado por la detoxificación de hidroperóxidos catalizada por GST, como se ha observado en otras especies (West y Marnett, 2006).

No se observó daño oxidativo en proteínas, dado que la concentración de GC no se modificó a ninguna de las concentraciones de IMI ensayadas, excepto en hígado donde se detectó una disminución en la concentración de este biomarcador a 100 µg/L IMI. Esta



disminución indicaría un reemplazo en las proteínas a partir del proceso de estrés oxidativo observado, involucrando la remoción de las proteínas oxidadas y síntesis *de novo* de otras proteínas. Dondero *et al.* (2010) observaron que el efecto molecular más evidente en el mejillón *Mytilus galloprovincialis* expuesto a IMI fue el incremento de ARN mensajeros de 14 genes relacionados a la traducción de nuevas proteínas.

La actividad de SOD disminuyó en los tres tejidos de *A. facetus* cuando se expuso a 100 y a 1000 µg/L IMI. Si bien en el ensayo concentración- respuesta la disminución de SOD a 100 µg/L IMI no fue significativa en hígado, mostró una tendencia a la disminución, que fue confirmada estadísticamente en el ensayo tiempo- respuesta. Debido a que la actividad de SOD puede producir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por dismutación del radical anión superóxido (McCord y Fridovich, 1969), la disminución de la actividad de SOD en hígado puede ser explicada por una respuesta regulatoria negativa al incremento en las concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o bien pudo ser producto del daño provocado por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al sitio activo de la enzima (Hodgson y Fridovich, 1975). Este tipo de respuesta (aumento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y disminución de SOD) ya ha sido informada en el hígado de *A. facetus* expuesto al organoclorado endosulfán, un insecticida generador de estrés oxidativo (Crupkin *et al.*, 2013). En branquias y encéfalo la disminución en la actividad de SOD estuvo relacionada a un aumento del daño oxidativo en estos tejidos, patrón descrito previamente en la literatura para el ciprínido *Girardinichthys viviparus* expuesto a aguas contaminadas (Vega-López *et al.*, 2008). Si bien en estos tejidos no se observó aumento de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, otras ERO pudieron haber afectado el sitio activo de la enzima.

Los resultados obtenidos muestran que CAT y SOD son las enzimas más sensibles en *A. facetus* expuesto a IMI. Mientras que CAT respondió a las 12 h, SOD lo hizo a las 24 y 48 hs en concordancia con Vutukuru *et al.* (2006), quienes sostuvieron que CAT suele ser un biomarcador más sensible que SOD en los peces teleósteos. El hecho de observar estrés oxidativo en el hígado sin el consecuente incremento de MDA seguramente se debió a la

gran capacidad que tiene el hígado para detoxificar compuestos tanto endógenos como xenobióticos (Di Giulio y Hinton, 2008). Por otro lado, en branquias, se observó daño oxidativo en lípidos, hecho que cobra relevancia debido a que en los peces este tejido representa una de las principales vías de ingreso de compuestos disueltos en el agua, y un daño en estas membranas podría afectar sus funciones, como son el intercambio gaseoso, el balance iónico e hídrico, la regulación ácido- base y la excreción de nitrógeno (Lien y McKim, 1993). En el encéfalo también se produjo peroxidación lipídica posiblemente debido a que, como se ha descrito en la literatura, el encéfalo posee una alta cantidad de ácidos grasos poliinsaturados fácilmente oxidables (Song *et al.*, 2006) y su sistema de defensas antioxidantes es relativamente bajo (Mates, 2000).

El daño oxidativo del IMI descrito en *A. facetus* también ha sido descrito para otras especies acuáticas. Por ejemplo, el crustáceo anfípodo *Gammarus fossarum* sufrió peroxidación lipídica luego de 24 hs de exposición a 102,2 µg/L del ingrediente activo IMI, mientras que al exponerlo a la formulación comercial también mostró un aumento en la actividad de CAT y de GST, pero ambos aumentos a concentraciones de IMI mayores a las de la presente tesis (Malev *et al.*, 2012). Sin embargo, en el crustáceo *Daphnia magna* expuesto durante 48 hs a concentraciones de IMI entre 10 y 40 mg/L, no se observó este tipo de cambios en las actividades enzimáticas de GST y CAT (Tisler *et al.*, 2009).

La información respecto al posible efecto del estrés oxidativo en peces expuestos a IMI es escasa en la literatura disponible. Un estudio llevado a cabo por Ge *et al.* (2015) en el pez cebra (*Danio rerio*) mostró que SOD, CAT y GST aumentaron su actividad luego de 7 días de exposición a IMI, pero a los 28 días se inhibieron. En el estudio mencionado las concentraciones ensayadas fueron del orden de los mg/L IMI. Estas altas concentraciones de IMI incrementaron también la concentración de MDA luego de 21 días de exposición (Ge *et al.*, 2015).

Respecto a organismos terrestres, los efectos relacionados al posible efecto de estrés

oxidativo provocado por IMI han sido estudiados en mayor profundidad que en los acuáticos. Particularmente, en ovarios de ratas expuestas a 20 mg/kg/día IMI durante 90 días, se observaron cambios en la actividad enzimática de CAT, GPX y SOD, así como las concentraciones de MDA y GSH (Kapoor *et al.*, 2011). Sin embargo, otros estudios mostraron estrés oxidativo a tiempos de exposición menores y concentraciones de IMI menores, como una exposición de 1 mg/kg/día durante 30 días (Duzguner y Erdogan, 2012) o a 0,21 mg/kg/día durante 28 días (Mohany *et al.*, 2011).

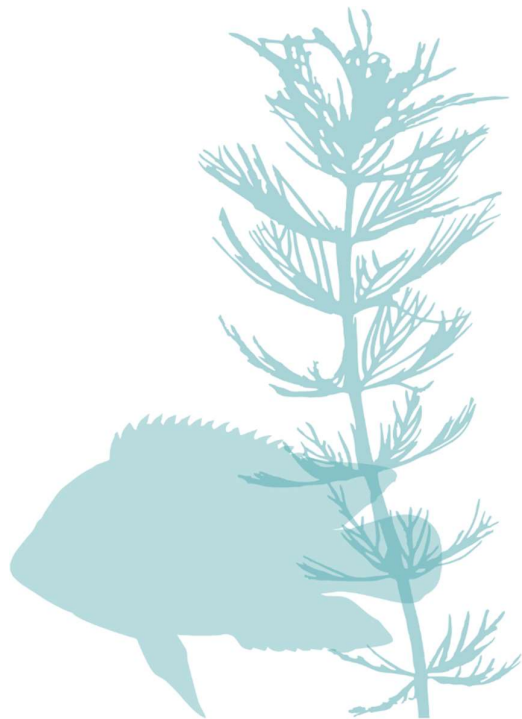
## Bibliografía

- Almeida JA, Diniz YS, Marques SFG, Faine LA, Ribas BO, Burneiko RC y Novelli ELB. 2002. The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination. *Environment International*, 27(8), 673–679.
- Anderson JC, Dubetz C y Palace VP. 2015. Neonicotinoids in the Canadian aquatic environment: A literature review on current use products with a focus on fate, exposure, and biological effects. *Science of the Total Environment*, 505, 409–422.
- Casida JE. 2011. Neonicotinoid metabolism: Compounds, substituents, pathways, enzymes, organisms, and relevance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(7), 2923–2931.
- Connell DW. 2005. CRC Press. Taylor & Francis Group. Boca Raton, FL, USA. 468 pp.
- Crupkin AC, Carriquiriborde P, Mendieta J, Panzeri AM, Ballesteros ML, Miglioranza KSB y Menone ML. 2013. Oxidative stress and genotoxicity in the South American cichlid, *Australoheros facetus*, after short-term sublethal exposure to endosulfan. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 105(2), 102–110.
- Davies KJ. 2000. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life*, 50(4–5), 279–89.
- Del Rio D, Stewart AJ y Pellegrini N. 2005. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 15(4), 316–328.
- Di Giulio RT y Hinton DE. 2008. *The toxicology of fishes*. CRC Press Taylor & Francis Group. Boca Raton, FL, USA. 1071 pp.
- Dondero F, Negri A, Boatti L, Marsano F, Mignone F y Viarengo A. 2010. Transcriptomic and proteomic effects of a neonicotinoid insecticide mixture in the marine mussel (*Mytilus galloprovincialis*, Lam.). *Science of the Total Environment*, 408(18), 3775–3786.
- Duzguner V y Erdogan S. 2012. Chronic exposure to imidacloprid induces inflammation and oxidative stress in the liver & central nervous system of rats. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 104(1), 58–64.
- Ge W, Yan S, Wang J, Zhu L, Chen A y Wang J. 2015. Oxidative Stress and DNA Damage Induced by Imidacloprid in Zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(6), 1856–1862.
- Hodgson EK y Fridovich I. 1975. The interaction of Bovine Erythrocyte Superoxide dismutase with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inactivation of the enzyme. *Biochemistry*, 14(24), 5294–5299.
- Iturburu FG, Zömis M, Panzeri AM, Crupkin AC, Contardo-Jara V, Pflugmacher S y Menone ML. 2017. Uptake, distribution in different tissues and genotoxicity of imidacloprid in the freshwater fish *Australoheros facetus*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36, 699–708.
- Kapoor U, Srivastava MK y Srivastava LP. 2011. Toxicological impact of technical imidacloprid on ovarian morphology, hormones and antioxidant enzymes in female rats. *Food and Chemical Toxicology*, 49(12), 3086–3089.
- Lien G y McKim JM. 1993. Predicting branchial and cutaneous uptake of (*Pimephales promelas*) and Japanese medaka (*Oryzias latipes*): Rate limiting factors. *Aquatic Toxicology*, 27, 15–32.
- Madeira C, Madeira D, Diniz MS, Cabral HN y Vinagre C. 2016. Thermal acclimation in clownfish: An integrated biomarker response and multi-tissue experimental approach. *Ecological Indicators*, 71, 280–292.

- Malev O, Klobucar RS, Fabbretti E y Trebse P. 2012. Comparative toxicity of imidacloprid and its transformation product 6-chloronicotinic acid to non-target aquatic organisms: Microalgae *Desmodesmus subspicatus* and amphipod *Gammarus fossarum*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 104(3), 178–186.
- McCord JM y Fridovich I. 1969. Superoxide Dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *The Journal of Biological Chemistry*, 244(22), 6049–6055.
- Mates JM. 2000. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*, 153, 83–104.
- Mohany M, Badr G, Refaat I y El-feki M. 2011. Immunological and histological effects of exposure to imidacloprid insecticide in male albino rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 5(18), 2106–2114.
- Monteiro DA, de Almeida JA, Rantin FT y Kalinin AL. 2006. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 143(2), 141–149.
- Mourente G, Diaz-Salvago E, Bell JG y Tocher DR. 2002. Increased activities of hepatic antioxidant defence enzymes in juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fed dietary oxidised oil: Attenuation by dietary vitamin E. *Aquaculture*, 214(1–4), 343–361.
- Oliveira M, Pacheco M y Santos MA. 2008. Organ specific antioxidant responses in golden grey mullet (*Liza aurata*) following a short-term exposure to phenanthrene. *Science of the Total Environment*, 396(1), 70–78.
- Ozcan Oruc E y Usta D. 2007. Evaluation of oxidative stress responses and neurotoxicity potential of diazinon in different tissues of *Cyprinus carpio*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 23(1), 48–55.
- Ozcan Oruc E, Sevgiler Y y Uner N. 2004. Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 137(1), 43–51.
- Prieto AI, Jos Á, Pichardo S, Moreno I y Cameán AM. 2006. Differential oxidative stress responses to microcystins LR and RR in intraperitoneally exposed tilapia fish (*Oreochromis sp.*). *Aquatic Toxicology*, 77(3), 314–321.
- Song SB, Xu Y y Zhou BS. 2006. Effects of hexachlorobenzene on antioxidant status of liver and brain of common carp (*Cyprinus carpio*). *Chemosphere*, 65(4), 699–706.
- Su F, Zhang S, Li H y Guo H. 2007. In vitro acute cytotoxicity of neonicotinoid insecticide imidacloprid to gill cell line of flounder *Paralichthys olivaceus*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 25(2), 209–214.
- Tišler T, Jemec A, Mozetič B, Trebše P. 2009. Hazard identification of imidacloprid to aquatic environment. *Chemosphere*, 76(7), 907–914.
- Valavanidis A, Vlahogianni T, Dassenakis M y Scoullos M. 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64(2), 178–189.
- Vega-López A, Jiménez-Orozco FA, García-Latorre E y Domínguez-López ML. 2008. Oxidative stress response in an endangered goodeid fish (*Girardinichthys viviparus*) by exposure to water from its extant localities. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71(1), 94–103.
- Vutukuru SS, Chintada S, Radha Madhavi K, Venkateswara Rao J y Anjaneyulu Y. 2006. Acute effects of copper on superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation in the freshwater teleost fish, *Esomus danricus*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 32(3), 221–229.

- West JD y Marnett LJ. 2006. Endogenous Reactive Intermediates as Modulators of Cell Signaling and Cell Death. *Clinical Research in Toxicology*, 19(2), 173–194.

**6. Capítulo 4: Biomarcadores de daño genético  
en *Australoheros facetus* expuesto a  
imidacloprid.**



A continuación se describirán los resultados provenientes del análisis de las frecuencias de MN y AN en *A. facetus* expuesto a IMI, tanto de los ensayos concentración- y tiempo- respuesta, así como del EC y oxidación de bases del ADN del ensayo concentración- respuesta.

## 6.1. Resultados.

### 6.1.1. Bioensayo Concentración- respuesta en *A. facetus*. Genotoxicidad.

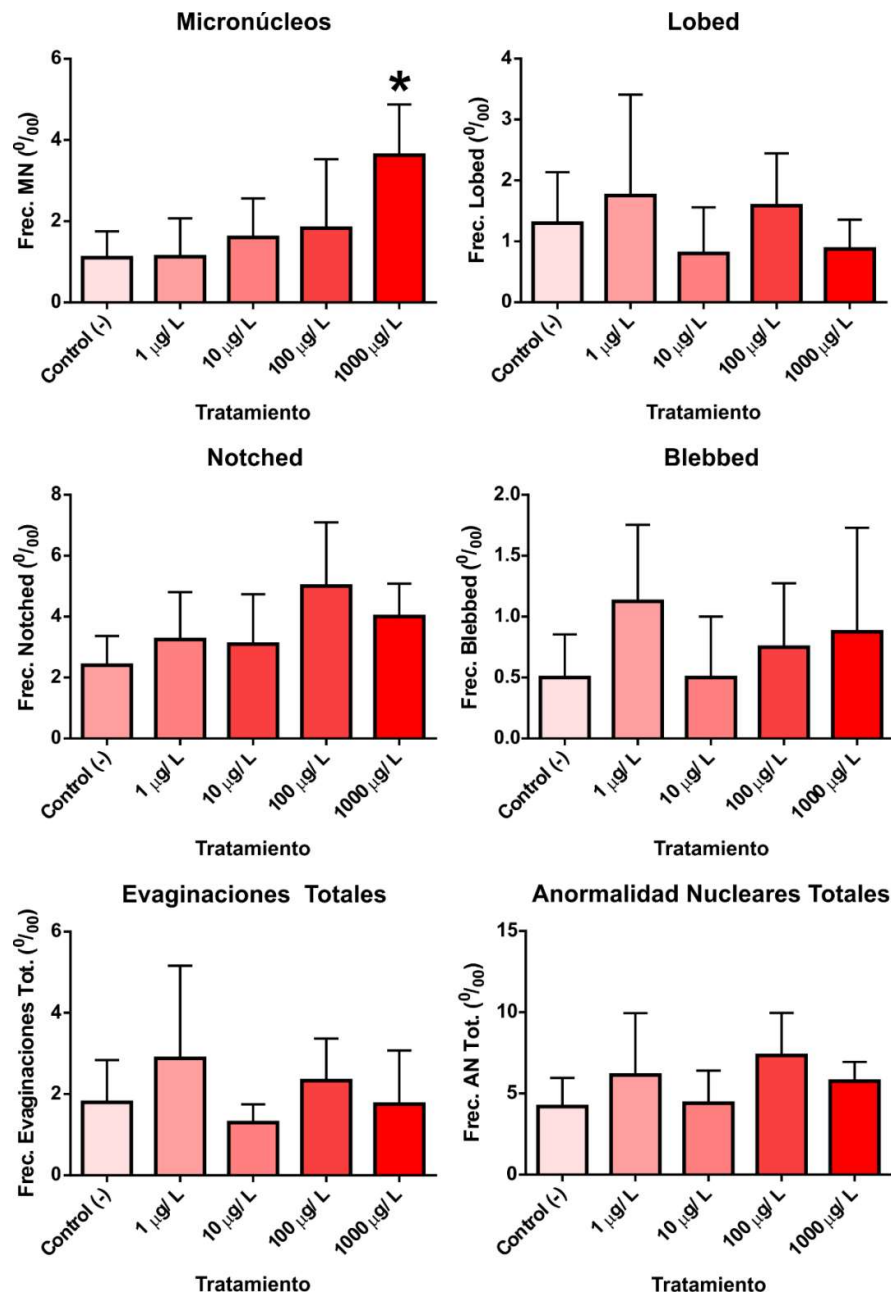
La frecuencia de MN presentó un rango de 0-2 ‰ en peces control y de hasta 5 ‰ para la mayor concentración de IMI. La frecuencia en eritrocitos de *A. facetus* expuesto a 1000 µg/ L IMI se incrementó en más de un 300% respecto al control ( $p < 0,05$ ). Por otro lado la frecuencia de las anomalías nucleares “lobed”, “notched”, “blebbed”, evaginaciones totales y anomalías nucleares totales no mostraron cambios respecto al control ( $p > 0,05$ , Figura 26).

En el caso de estos biomarcadores citogenéticos (MN y AN), tanto en este ensayo como en el de tiempo- respuesta no se realizó control positivo *in vivo*. Esto se debe a que previo a la presente tesis, se realizaron ensayos en *A. facetus* para corroborar su sensibilidad, es decir, la posibilidad de incrementar la frecuencia de MN ante la exposición a un compuesto con efectos genotóxicos reconocidos. Se comprobó que el agente alquilante del ADN metil metanosulfonato (MMS) incrementa la frecuencia de MN en *A. facetus* expuesto durante 24 hs (Iturburu *et al.*, 2013). Al no realizar este control positivo, se minimizó la cantidad de peces a utilizar en los ensayos de la presente tesis.

Por otra parte, los resultados del ensayo cometa también mostraron un efecto genotóxico del IMI en *A. facetus* (Figura 27). El IDEC se incrementó un 60 % en los preparados expuestos a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Para este control positivo *in vitro*, el IDEC aumentó un 60 % respecto al del C(-) ( $p < 0,05$ ). Respecto a los tratamiento con IMI, la



exposición a 100 y 1000  $\mu\text{g/L}$  mostraron un aumento significativo del IDEC ( $p < 0,05$ ), representando un incremento promedio de 50 y 70 % respectivamente en comparación con el C(-) (Tabla 9). En el caso de los sitios ENDO, tanto el conteo de las muestras del C(+) como las provenientes de peces expuestos a todas las concentraciones ensayadas de IMI, se vio incrementado significativamente ( $p < 0,05$ , Tabla 9).



**Figura 26: Curvas Concentración- Respuesta *Australoheros facetus*. Micronúcleos y Anormalidades Nucleares.** Se observan las frecuencias de micronúcleos y anormalidades nucleares en eritrocitos de especímenes de *Australoheros facetus* expuestos a diferentes concentraciones de IMI durante 48 h. \*: diferencia significativas respecto al control (-) ( $p < 0,05$ ; micronúcleos, blebbed y evaginaciones totales test de ANOVA/ Dunnett; lobed, notched y evaginaciones totales test de Kruskal- Wallis/ Dunn).

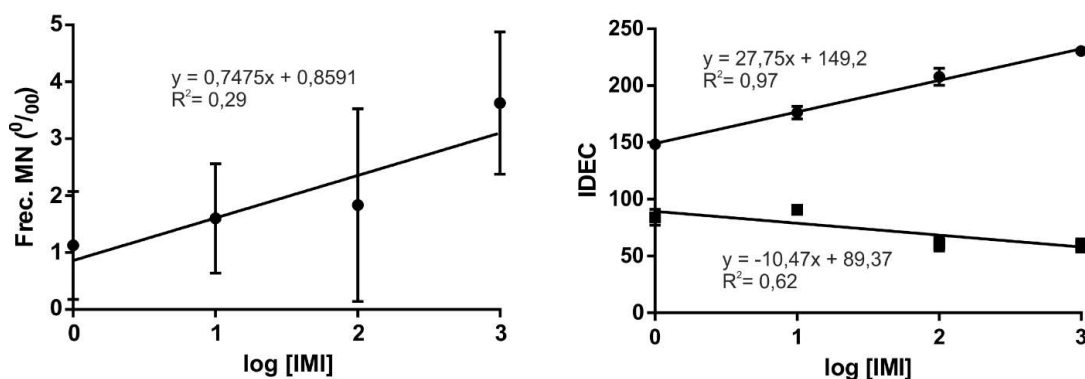


**Figura 27: Microfotografía de un preparado de ensayo “Cometa” en sangre de *Australoheros facetus*. 1. Nucleoide con daño categoría 1. 2. Nucleoide con daño categoría 2.**

El test de regresión lineal simple para caracterizar si los biomarcadores que mostraron diferencias significativas lo hacían de modo concentración- dependiente, mostró distintos resultados dependiendo del marcador. Para la frecuencia de MN así como para el IDEC la regresión de cada biomarcador en función del logaritmo de la concentración de IMI, mostró una pendiente positiva y significativamente distinta de 0 ( $p < 0,05$ ), con un coeficiente de determinación de  $R^2 = 0,29$  para la frecuencia de MN y  $R^2 = 0,97$  para el IDEC (Figura 28). Sin embargo, el puntaje de sitios ENDO en función del logaritmo de la concentración de IMI mostró diferencias significativas del valor de la pendiente respecto a 0 ( $p < 0,05$ ,  $R^2 = 0,62$ ), pero siendo la misma negativa (Figura 28).

Químico	Concentración (µg/L)	IDEC	Conteo Sitios ENDO
Control Negativo (C-)		137 ± 4	14 ± 3
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (C+)	1700 (≈50 µM)	222 ± 2	47 ± 3*
Imidacloprid	1	149 ± 5	84 ± 7*
	10	176 ± 6	91 ± 2*
	100	208 ± 8*	61 ± 6*
	1000	231 ± 4*	59 ± 6*

**Tabla 9: Índice de daño del ensayo cometa y conteo sitios ENDO en *Australoheros facetus* expuesto a imidacloprid.** Los resultados se expresan como media ± desvío estándar en eritrocitos del pez *Australoheros facetus* (n= 6) expuesto a imidacloprid. \*: diferencia significativa respecto al control negativo (p< 0,05; test de Kruskal- Wallis/ Dunn para índice de daño y test de ANOVA/ Dunnett para sitios ENDO).



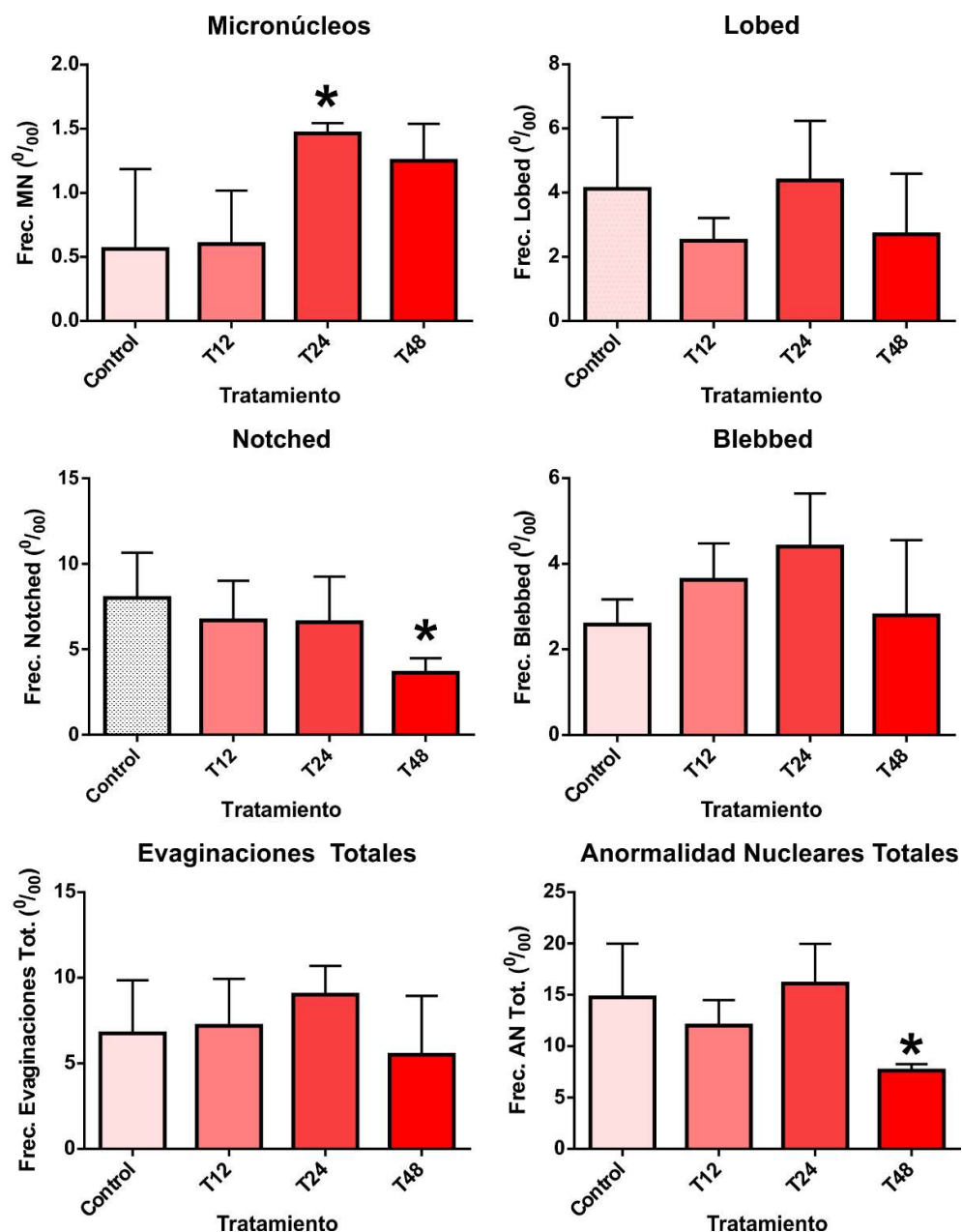
**Figura 28. Regresiones lineales en biomarcadores de genotoxicidad en *Australoheros facetus* expuesto a imidacloprid.** Derecha: Regresión lineal del logaritmo de la concentración de imidacloprid y el índice de daño del ensayo cometa en el pez *Australoheros facetus* expuesto a imidacloprid. ● = índice de daño del ensayo cometa, ■ = conteo sitios ENDO III (ENDO); media ± d.e. Izquierda: Regresión lineal del logaritmo de la concentración de imidacloprid y la frecuencia de micronúcleos. ● = frecuencia de micronúcleos; media ± d.e.

### 6.1.2. Bioensayo Tiempo- respuesta en *A. facetus*. Genotoxicidad.

No se obtuvieron resultados de los preparados realizados para la cuantificación de MN y AN de los peces control a 12 h, debido a que resultaron de mala calidad e imposibilitaron la cuantificación de las frecuencias de estos marcadores para este

tratamiento. Por lo tanto, se compararon las frecuencias de MN y las de AN en los controles a 24 y 48 h entre sí y al no observarse diferencias significativas en ninguna de las frecuencias ( $p > 0,05$ ), se procedió a realizar un nuevo grupo denominado “control” que reunió tanto las frecuencia de MN y AN a las 24 como a las 48 h. Es así como se compararon los tratamientos de 12, 24 y 48 h de exposición a 100  $\mu\text{g/L}$  con dicho control.

A las 24 h de exposición, se incrementó la frecuencia de MN respecto al control ( $p < 0,05$ ), mientras que hubo una disminución tanto de las AN del tipo “notched” como las AN totales cuando se expuso durante 48 h ( $p < 0,05$ , Figura 29). Las anormalidades lobed, blebbed, evaginaciones totales y AN totales no mostraron diferencias significativas respecto al control cuando se expuso los especímenes durante 12, 24 y 48 hs ( $p > 0,05$ , Figura 29).



**Figura 29: Curvas Tiempo- Respuesta *Australoheros facetus*. Micronúcleos y Anormalidades Nucleares.** Se observan las frecuencias de micronúcleos y anormalidades nucleares en eritrocitos de especímenes de *Australoheros facetus* expuestos a 100 µg/ L de imidacloprid durante 12, 24 y 48 h. \*: diferencia significativas respecto al control (-) (micronúcleos y anormalidades nucleares test de Kruskal- Wallis/ Dunn; lobed, notched, blebbed y evaginaciones totales ANOVA/ Dunnett).

## 6.2. Discusión.

El estudio del daño al ADN causado por IMI comenzó a ser estudiado en diferentes modelos, tanto en ensayos *in vitro* e *in vivo*, hace alrededor de 20 años. Respecto a

estudios *in vitro*, se observó que IMI producía aductos de ADN en cultivos de timo bovino, luego de la activación metabólica del insecticida con la fracción enzimática microsomal S9 de ratas (Shah *et al.*, 1997). Más recientemente, ensayos con líneas celulares (de cáncer de hígado humano HepG2 y de ovario de hámster chino CHOK1) mostraron que un amplio rango de concentraciones (desde 1,4  $\mu$ M hasta 0,1 M) producen efectos genotóxicos (Bianchi *et al.*, 2015; Al Sarar *et al.*, 2015). Otros estudios *in vitro* con linfocitos de sangre humana periférica han evidenciado que IMI incrementó la frecuencia de MN e IDEC (Costa *et al.*, 2009) así como el intercambio de cromátides hermanas a concentraciones desde 20 a 400  $\mu$ M IMI ( $\approx$  5 a 100 mg/ L) en exposiciones agudas (Feng *et al.*, 2005). Además, formulaciones comerciales de IMI, denominadas “Gaucho” y “Jade” (Bayer), mostraron genotoxicidad en el mismo rango de concentraciones y el mismo modelo *in vitro* luego de 2 hs de exposición (Calderón-Segura *et al.*, 2012).

Los estudios *in vivo* de genotoxicidad de IMI en vertebrados terrestres se han enfocado principalmente en roedores. Estos trabajos apuntaron a determinar el daño al ADN en la sangre o tejidos espermatogónicos, encontrando daño con concentraciones de 8 mg/kg/día IMI para exposiciones crónicas (Bal *et al.*, 2012) y a 170 mg para exposiciones únicas (Arslan *et al.*, 2015). Bagri *et al.* (2015) también encontraron genotoxicidad al exponer con IMI a ratas hembra en gestación, junto a un aumento en el número de embriones implantados muertos.

El análisis de los resultados de las frecuencias de MN y AN así como del IDEC de las muestras resultantes de los ensayos concentración- y tiempo- respuesta dejan en manifiesto el efecto genotóxico de IMI en *A. facetus*. Más aún, el análisis de sitios ENDO denota un daño oxidativo subyacente como uno de los mecanismos de genotoxicidad posibles. Este resultado es altamente relevante debido a sus potenciales implicancias en la promoción de patologías y efectos a niveles de

organización biológica mayor. Futuros estudios deberían profundizar en este mecanismo.

Previo a la realización de la presente tesis, se demostró la genotoxicidad del formulado IMIDA NOVA 35 (35 % IMI) en especímenes de mayor tamaño (9 cm) de *A. facetus* (Iturburu, 2013). En la mencionada tesis de grado, se encontró que la frecuencia de MN se vio incrementada a 100 y 1000 µg/L IMI, cuando los especímenes fueron expuestos durante 24 hs. Los resultados de la presente tesis refuerzan ese estudio preliminar: a las 24 hs de exposición a 100 µg/ L IMI, tanto los especímenes de 9 cm expuestos al formulado comercial (Iturburu, 2013) como los de menor tamaño (7 cm) expuestos al ingrediente activo (presente tesis) sufren un incremento en la frecuencia de MN en sus eritrocitos. Sin embargo, la exposición a dicha concentración no generó efectos genotóxicos a las 48 hs de exposición, como sugiere el hecho de que la frecuencia de MN no aumentó en esas condiciones en ambos ensayos (concentración- y tiempo- respuesta). El hecho de que se observe un aumento significativo en la frecuencia de MN a las 24 hs y no a tiempos mayores, puede estar relacionado a la cinética de las células sanguíneas y a su recambio. Este tipo de efecto ya ha sido observado por Campana *et al.* (1999), quienes observaron que la mayor frecuencia de MN en el pez *Cheirodon interruptus interruptus* al ser expuesto al piretroide lambda- ciotrina se detectaba a las 24 hs, y luego la misma disminuía. Los autores postularon que el compuesto podría estar causando muerte celular y afectando el ciclo celular, pero es necesario ahondar en estudios que corroboren este postulado para el caso del IMI con *A. facetus*.

El IDEC generalmente es un biomarcador más sensible para la detección del daño al ADN que el biomarcador citogenético frecuencia de MN (Araldi *et al.*, 2015). Este hecho fue confirmado en *A. facetus*, considerando que se observó un aumento significativo del IDEC con una concentración un orden de magnitud menor que la



concentración necesaria para aumentar la frecuencia de MN a las 48 hs (100 vs. 1000  $\mu\text{g/L}$ ). Este resultado apoyaría la hipótesis de que IMI genera genotoxicidad a 100  $\mu\text{g/L}$  tanto a 24 como a 48 hs, pero la frecuencia de MN a 48 hs no es efectiva en evidenciar este efecto, probablemente debido al reemplazo de células dañadas. Es así como en la presente tesis, los resultados del ensayo tiempo- respuesta mostraron información complementaria al ensayo concentración- respuesta.

Los resultados de la presente tesis indican una dependencia de los efectos genotóxicos con la concentración, tanto a partir del análisis de la frecuencia de MN como del IDEC. Estudios previos en el laboratorio demostraron este tipo de respuesta concentración- dependiente en especímenes de *A. facetus* de mayor tamaño (9 cm) expuestos durante 24 hs al formulado comercial IMIDA NOVA (35 % IMI, Iturburu, 2013). Del mismo modo, estudios con linfocitos de sangre humana periférica (Feng *et al.*, 2005) y con ratas, tanto a largo plazo (Karabay y Oguz, 2005) como en exposiciones agudas (Kataria *et al.*, 2015) han demostrado este tipo de relación.

Estos dos biomarcadores fueron analizados también en la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) expuesta a IMI durante 96 hs, mostrando el mismo patrón, y en el mismo rango de concentraciones que las ensayadas en esta tesis (Ansoar-Rodriguez *et al.*, 2015). Otros estudios de genotoxicidad en peces expuestos a IMI, mostraron daño al ADN pero con concentraciones y tiempos de exposición mayores, con 300  $\mu\text{g/L}$  IMI y siete días de exposición para el pez cebra (*Danio rerio*, Ge *et al.*, 2015) y con 43  $\text{mg/L}$  y 6 días de exposición para el ciprínido asiático *Misgurnus anguillicaudatus* (Xia *et al.*, 2016).

El EC modificado con la enzima ENDO III en peces expuestos a IMI resultó altamente sensible ya que mostró efectos desde 1 a 1000  $\mu\text{g/L}$  IMI. El aumento del conteo de sitios ENDO III denota un daño oxidativo, y representa un paso importante

en la comprensión del mecanismo de genotoxicidad del IMI. En la literatura, la relación entre daño al ADN y ERO tiene su precedente en otras especies utilizadas en estudios de ecotoxicología. Por ejemplo, en el modelo estandarizado pez cebra (*Danio rerio*) y en la lombriz roja (*Eisenia fetida*) se encontró tanto un aumento de las ERO como daño al ADN evidenciado mediante el EC (Ge *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015).

Existen pocos estudios disponibles en la literatura acerca de la genotoxicidad del IMI en vertebrados acuáticos (Tabla 10). La mínima concentración a la que se encontró un efecto genotóxico (LOEC, por el inglés “lowest observed effect concentration”) en anfibios en ensayos *in vivo*, se describió en el rango entre 8 y 30 mg/ L IMI (Feng *et al.*, 2004; Pérez Iglesias *et al.*, 2014, Ruíz de Arcaute *et al.*, 2014), concentraciones más altas que las que demostraron genotoxicidad en *A. facetus* en la presente tesis. Aunque el mecanismo responsable de la formación de las AN no es completamente comprendido y no está internacionalmente aceptado que estas sean parámetros o biomarcadores de genotoxicidad (Gökalp Muranli *et al.*, 2011), la cuantificación de las mismas cobra importancia debido a su notoria presencia en los preparados.

En esta tesis, los resultados de la frecuencia de evaginaciones nucleares totales no reprodujeron el aumento observado en trabajos previos con la especie (Iturburu, 2013). Una correlación positiva entre la oxidación del ADN mediante el biomarcador 8-OHdG y las AN en especies salvajes de peces expuestos a contaminación química fue informada por Oliveira *et al.* (2010), llevando a los autores a sugerir que el estrés oxidativo puede ser un mecanismo involucrado en la formación de anomalías nucleares.

Considerando entonces la falta de reproducibilidad de las frecuencias de AN y su aún no elucidado proceso de formación, la cuantificación de las mismas no resultó un biomarcador de genotoxicidad confiable.

Especie	Biomarcador	LOEC (mg/L)	LC <sub>50</sub> (mg/L)	Referencia
<i>Rana N. Hallowell</i> (renacuajos)	MN	8	219 (48 hs) 129 (96 hs)	Feng <i>et al.</i> , 2004
<i>Rana limnocharis</i> (renacuajos)			165 (48 hs) 82 (96 hs)	
<i>Rana N. Hallowell</i> (eritrocitos)	cometa	0,05 (1 h)		
<i>Hypsiboas pulchellus</i> (renacuajos)	MN	15 (48 hs)	92,58 (48 hs)	Ruíz de Arcaute <i>et al.</i> , 2014
	cometa	30 (48 hs)	84,91 (96 hs)	
	AN	15 (48 hs)		
<i>Hypsiboas pulchellus</i> (renacuajos)	MN	25 (96 hs)	58,23 (48 hs)	Pérez Iglesias <i>et al.</i> , 2014
	cometa	12,5 (96 hs)	52,62 (96 hs)	
<i>Danio rerio</i> (pez)	cometa	0,3 (7 d)		Ge <i>et al.</i> , 2015
			241 (96 hs)	Tisler <i>et al.</i> , 2009
			214 (96 hs)	
<i>Misgurnus anguillicaudatus</i> (pez)	cometa	43 (6 d)	158,6 (48 hs)	Xia <i>et al.</i> , 2016
	MN	43 (48 hs)	145,8 (96 hs)	
	AN	43 (48 hs)		
<i>Oreochromis niloticus</i> (pez)	cometa	0,063 (96 hs)		Ansoar-Rodríguez <i>et al.</i> , 2015
	MN	0,25 (96 hs)		
	AN	0,25 (96 hs)		
<i>Australoheros facetus</i> (pez)			1 – 10 (24 h) <sup>a</sup>	Iturburu, 2013
	MN	0,1 (24 h)		Presente tesis
	MN	1 (48 h)		
	cometa	0,1 (48 h)		

**Tabla 10: Biomarcadores de genotoxicidad y valores de toxicidad aguda de imidacloprid en anfibios y peces.** a. Iturburu, 2013. Tesis de Grado.

Estudios de campo han encontrado concentraciones máximas entre 3,3 y 6,1 µg/L IMI en Norteamérica (Gobierno de Quebec, 2011), 4,6 µg/L en Australia (Sánchez-Bayo & Hyne, 2014) y valores extremos de 320 µg/L en Holanda (van Dijk *et al.*, 2013). Teniendo en cuenta estas concentraciones y otras mencionadas en la sección 1.4, se estima que el IMI, a concentraciones de relevancia ambiental generaría daño oxidativo al ADN y este, a concentraciones mayores, conduciría a la presencia de efectos clastogénicos en *A. facetus*.

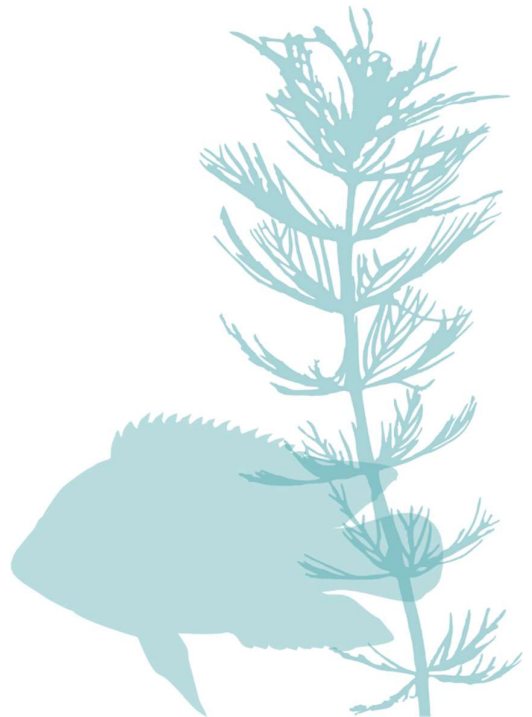
## Bibliografía:

- Al-Sarar AS, Abobakr Y, Bayoumi AE y Hussein HI. 2015. Cytotoxic and genotoxic effects of abamectin, chlorfenapyr, and imidacloprid on CHOK1 cells. *Environmental Science and Pollution Research*. <http://doi.org/10.1007/s11356-015-4927-3>.
- Ansoar-Rodríguez Y, Christofolletti CA, Marcato AC, Correia JE, Bueno OC, Malaspina O y Fontanetti CS. 2015. Genotoxic Potential of the Insecticide Imidacloprid in a Non-Target Organism (*Oreochromis niloticus* -Pisces). *Journal of Environmental Protection*, 6, 1360-1367.
- Araldi PR, Correa de Melo T, Mendes TB, de Sá Júnior PL, Nakano Nozima BH, Tiemi Ito E, de Carvalho RF, Barreiros de Souza E y de Cassia Stocco R. 2015. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 72, 74–82.
- Arslan M, Sevgiler Y, Buyukleyla M, Yardimci M, Yilmaz M y Rencuzogullari E. 2015. Sex-related effects of imidacloprid modulated by piperonyl butoxide and menadione in rats. Part II: genotoxic and cytotoxic potential. *Drug and Chemical Toxicology*, 1–6. DOI: 10.3109/01480545.2015.1029049.
- Bagri P, Kumar V y Sikka AK. 2015. An in vivo assay of the mutagenic potential of imidacloprid using sperm head abnormality test and dominant lethal test. *Drug and Chemical Toxicology*, 38(3), 342–348.
- Bal R., Türk G, Tuzcu M, Yilmaz O, Kuloglu T, Gundogdu R, Gür S, Agca A, Ulas M, Çambay Z, Tuzcu Z, Gencoglu H, Guvenc M, Ozsahin AD, Kocaman N, Aslan A y Etem E. 2012. Assessment of imidacloprid toxicity on reproductive organ system of adult male rats. *Journal of Environmental Science and Health. Part. B, Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes* 47, 434–444.
- Bianchi J, Cavalcanti Cabral-de-Mello D y Marin-Morales MA. 2015. Toxicogenetic effects of low concentrations of the pesticides imidacloprid and sulfentrazone individually and in combination in in vitro tests with HepG2 cells and *Salmonella typhimurium*. *Ecotoxicology Environmental Safety* 120,174–183.
- Calderón-Segura ME, Gómez-Arroyo S, Villalobos-Pietrini R, Martínez-Valenzuela C, Carbajal-López Y, Calderón-Ezquerro MDC, Cortés-Eslava J, García-Martínez R, Flores-Ramírez D, Rodríguez-Romero MI, Méndez-Pérez P y Bañuelos-Ruíz E. 2012. Evaluation of genotoxic and cytotoxic effects in human peripheral blood lymphocytes exposed in vitro to neonicotinoid insecticides news. *Journal of Toxicology*, 2012, 1-11.
- Campana MA, Panzeri AM, Moreno VJ y Dulout FN. 1999. Genotoxic evaluation of the pyrethroid lambda-cyhalothrin using the micronucleus test in erythrocytes of the fish *Cheirodon interruptus interruptus*. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 438(2), 155–161.
- Costa C, Silvari V, Melchinib A, Catania S, Heffronc JJ, Trovato A y De Pasquale R. 2009. Genotoxicity of imidacloprid in relation to metabolic activation and composition of the commercial product. *Mutation Research*, 672, 40 – 44.
- Feng S, Kong Z, Wang X, Peng P y Zeng EY. 2005. Assessing the genotoxicity of imidacloprid and RH-5849 in human peripheral blood lymphocytes in vitro with comet assay and cytogenetic tests. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 61(2), 239–246.
- Feng S, Kong Z, Wang X, Zhao L y Peng P. 2004. Acute toxicity and genotoxicity of two novel pesticides on amphibian, *Rana N. Hallowell*. *Chemosphere*, 56(5), 457–463.

- Ge W, Yan S, Wang J, Zhu L, Chen A y Wang J. 2015. Oxidative Stress and DNA Damage Induced by Imidacloprid in Zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 63 (6), 1856 – 1862.
- Gökalp Muranli FD y Güner U. 2011. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in erythrocytes of mosquito fish (*Gambusia affinis*) following exposure to the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin. *Mutation Research- Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 726(2), 104–108.
- Government of Quebec. 2011. Pesticides et nitrates dans l'eau souterraine pres de cultures de pommes de terre: Echantillonnage dans quelques regions du Quebec en 2008 et 2009. Quebec, Canada. (consultado 30 de enero de 2017). Disponible en:  
[http://www.mddelcc.gouv.qc.ca/pesticides/pomme\\_terre/pesti-nitrates2008-2009.pdf](http://www.mddelcc.gouv.qc.ca/pesticides/pomme_terre/pesti-nitrates2008-2009.pdf)
- Iturburu FG. 2013. Actividad de enzimas de estrés oxidativo y genotoxicidad del insecticida Imidacloprid en el pez dulceacuícola *Australoheros facetus*. Tesis de grado Lic. Ciencias Biológicas, FCEyN, UNMDP. 60 pp.
- Karabay NU y Oguz MG. 2005. Cytogenetic and genotoxic effects of the insecticides, imidacloprid and methamidophos. *Genetics and Molecular Research*, 4(4), 653–662.
- Kataria SK, Chhillar AK, Kumar A, Tomar M y Malik V. 2015. Cytogenetic and hematological alterations induced by acute oral exposure of imidacloprid in female mice. *Drug and Chemical Toxicology*, 1–7. DOI: 10.3109/01480545.2015.1026972.
- Oliveira M, Ahmad I, Maria VL, Ferreira CSS, Serafim A, Bebianno MJ, Pacheco M y Santos MA. 2010. Evaluation of oxidative DNA lesions in plasma and nuclear abnormalities in erythrocytes of wild fish (*Liza aurata*) as an integrated approach to genotoxicity assessment. *Mutation Research*, 703, 83–89.
- Pérez-Iglesias JM, Ruiz de Arcaute C, Nikoloff N, Dury L, Soloneski S, Natale GS y Larramendy ML. 2014. The genotoxic effects of the imidacloprid-based insecticide formulation Glacoxan Imida on Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 104, 120–6.
- Ruiz De Arcaute C, Pérez-Iglesias JM, Nikoloff N, Natale GS, Soloneski S y Larramendy ML. 2014. Genotoxicity evaluation of the insecticide imidacloprid on circulating blood cells of Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae) by comet and micronucleus bioassays. *Ecological Indicators*, 45, 632–639.
- Sanchez-Bayo F y Hyne RV. 2014. Detection and analysis of neonicotinoids in river waters—Development of a passive sampler for three commonly used insecticides. *Chemosphere* 99, 143–151.
- Shah RG, Lagueux J, Kapur S, Levallois P, Ayotte P, Tremblay M, Zee J y Poirier GG. 1997. Determination of genotoxicity of the metabolites of the pesticides Guthion, Sencor, Lorox, Reglone, Daconil and Admire by 32P-postlabeling. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 169(1–2), 177–184.
- Van Dijk TC, Van Staalkduin MA y Van der Sluijs JP. 2013. Macroinvertebrate decline in surface water polluted with imidacloprid. *PloS One* 8:e62374.
- Wang K, Qi S, Mu X, Chai T, Yang Y, Wang D, Li D, Che W y Wang C. 2015. Evaluation of the Toxicity, AChE Activity and DNA Damage Caused by Imidacloprid on Earthworms, *Eisenia fetida*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 95(4), 475–480.

- Xia X, Xia X, Huo W, Dong H, Zhang L y Chang Z. 2016 . Toxic effects of imidacloprid on adult loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 45, 132–139.

## 7. Consideraciones finales



A partir del análisis de los biomarcadores y su comparación entre *M. quitense* y *A. facetus*, los resultados de esta tesis demuestran la importancia de analizar la sensibilidad de los biomarcadores en la selección de los organismos biomonitores ante la exposición a IMI. Se observó que los datos en *M. quitense* no fueron reproducibles entre las curvas de concentración- y tiempo- respuesta; mientras que en *A. facetus* las respuestas entre ambas curvas fueron más consistentes. Así, mientras en *M. quitense* se observó la disminución significativa de clorofilas A, B y totales y no se observaron efectos en los biomarcadores de estrés oxidativo a 100 µg/ L IMI en la curva concentración- respuesta, este patrón no se reprodujo en la curva tiempo- respuesta. Contrariamente, algunas respuestas observadas en la curva tiempo- respuesta tales como la disminución de las actividades de CAT, POD y la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no se reprodujeron en la curva de concentración- respuesta. Por otra parte, en términos generales las respuestas observadas en *A. facetus* tales como la disminución de la actividad de SOD y el incremento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y MDA mostraron un patrón similar en los tres tejidos analizados en ambas curvas.

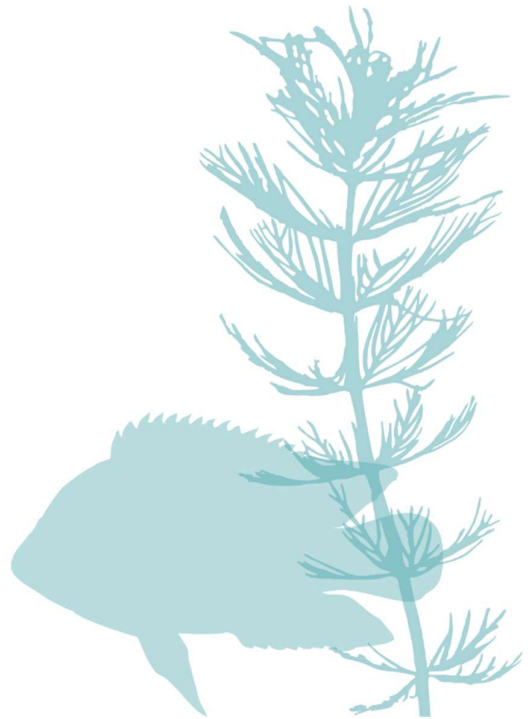
El IMI produjo efectos tóxicos subletales en las dos especies biomonitoras propuestas en concentraciones de relevancia ambiental (10- 100 µg/ L IMI), alertando sobre la necesidad no sólo de monitorear las concentraciones de IMI presentes en los cuerpos de agua superficiales, sino también de estudiar efectos tales como estrés oxidativo y genotoxicidad en las especies que allí habitan. Así, a partir de los datos plausibles de ser comparados entre ambas especies, *A. facetus* mostró respuestas de los biomarcadores de estrés oxidativo a concentraciones a partir de 100 µg/L IMI, mientras que *M. quitense* lo hizo a partir de un orden de magnitud menor. Sin embargo, como se mencionó previamente, estas respuestas fueron menos robustas en *M. quitense*.

En caso de utilizar peces en el biomonitoreo ambiental los resultados de esta tesis



sugieren la conveniencia de usar biomarcadores de genotoxicidad debido a sus respuestas consistentes que resultaron más confiables que los biomarcadores de estrés oxidativo.

## 8. Contraste de hipótesis y conclusiones



## **En cuanto al análisis de las hipótesis planteadas:**

### **1. El imidacloprid inhibe el crecimiento de *M. quitense* y afecta la fotosíntesis disminuyendo las concentraciones de clorofilas A y B.**

- La hipótesis se rechaza, debido a que el crecimiento de *M. quitense* no se modificó respecto del control negativo luego de 14 días de exposición. Además, si bien a las 48 hs de exposición las concentraciones de clorofilas A y B disminuyeron, luego de 14 días de exposición se observó un incremento de las mismas.

### **2. El imidacloprid genera estrés y daño oxidativo en *M. quitense*.**

- No hay evidencia suficiente para rechazar la hipótesis, debido a que: a) en la curva de concentración- respuesta se observó un incremento de las concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y MDA a 10 µg/L IMI luego de 48 hs de exposición, b) en la curva de tiempo- respuesta se observó una inhibición de CAT y POD a 100 µg/L IMI luego de 48 hs de exposición.

### **3. El imidacloprid es incorporado por *A. facetus* siendo mayor la concentración en los tejidos a mayor tiempo de exposición y a mayor concentración de imidacloprid en el medio.**

- No hay evidencia suficiente para rechazar la hipótesis, debido a que se detectaron concentraciones cuantificables de IMI en todos los tejidos del pez analizados, y esta fue mayor cuanto mayor el tiempo de exposición. Además, también se observó que las concentraciones de IMI incrementaron con el aumento de la concentración de IMI en el medio.

**4. El imidacloprid genera estrés y daño oxidativo en *A. facetus*.**

- No hay evidencia suficiente para rechazar la hipótesis, debido a que se observó la inhibición de la enzima antioxidante SOD en hígado, branquias y encéfalo, acompañado de un incremento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el hígado y de MDA en branquias y encéfalo.

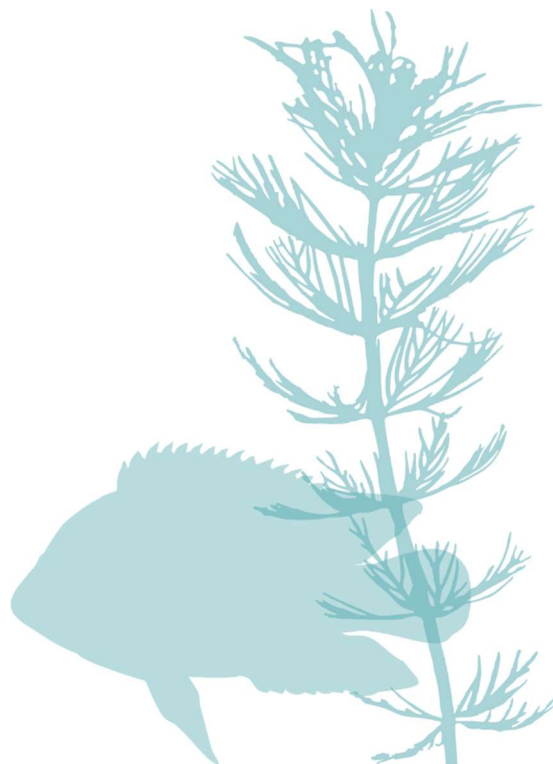
**5. El imidacloprid genera daño genético en *A. facetus*, siendo uno de los mecanismos el daño oxidativo a las bases de ADN.**

- No hay evidencia suficiente para rechazar la hipótesis, debido a que se observó un incremento de: a) la frecuencia de MN a 1000 µg/L IMI, b) la fragmentación del ADN a 100 y 1000 µg/L IMI y c) los valores de sitios ENDO III a todas las concentraciones de IMI ensayadas.

**A partir del análisis de los resultados obtenidos en la presente tesis se obtuvieron a las siguientes conclusiones:**

- El neonicotinoide imidacloprid no afectó el crecimiento de la macrófita *M. quitense*, sin embargo modificó las concentraciones de clorofilas y generó estrés y daño oxidativo.
- El imidacloprid se incorporó en encéfalo, sangre, branquias, músculo, hígado e intestino de *A. facetus*, pero no se bioacumuló.
- El imidacloprid generó estrés y daño oxidativo en hígado, branquias y encéfalo de *A. facetus*.
- El imidacloprid generó genotoxicidad en *A. facetus* de manera concentración-dependiente.
- Tanto la macrófita *M. quitense* como el pez *A. facetus* resultaron biomonitores adecuados para la detección de la contaminación de origen agrícola por imidacloprid, siendo los biomarcadores de *A. facetus* más consistentes para este fin.

## 9. Apéndice



## Apartado 1: medio nutritivo Hoagland

Solución 1: Nitrato de Calcio ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ).....524 mg/ L  $\text{H}_2\text{O}_d$

Solución 2: Nitrato de Potasio ( $\text{KNO}_3$ ) .....221 mg/ L  $\text{H}_2\text{O}_d$

Solución 3: Sulfato de Magnesio ( $\text{MgSO}_4$ ).....218 mg/ L  $\text{H}_2\text{O}_d$

Solución 4: Fosfato de Potasio ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ).....62 mg/ L  $\text{H}_2\text{O}_d$

Solución 5:

Ácido bórico ( $\text{B}(\text{OH})_3$ ).....8,015 mg/ 7 mL  $\text{H}_2\text{O}_d$

Sulfato de Zinc ( $\text{ZnSO}_4$ ) .....2,024 mg/ 23 mL  $\text{H}_2\text{O}_d$

Sulfato de Cobre ( $\text{CuSO}_4$ ).....1,011 mg/ 32 mL  $\text{H}_2\text{O}_d$

Cloruro de Manganeseo ( $\text{MnCl}_2$ )..... 2,052 mg/ 3 mL  $\text{H}_2\text{O}_d$

Molibdato de Sodio ( $\text{NaMoO}_4$ ).....2,0188 mg/ 49 mL  $\text{H}_2\text{O}_d$

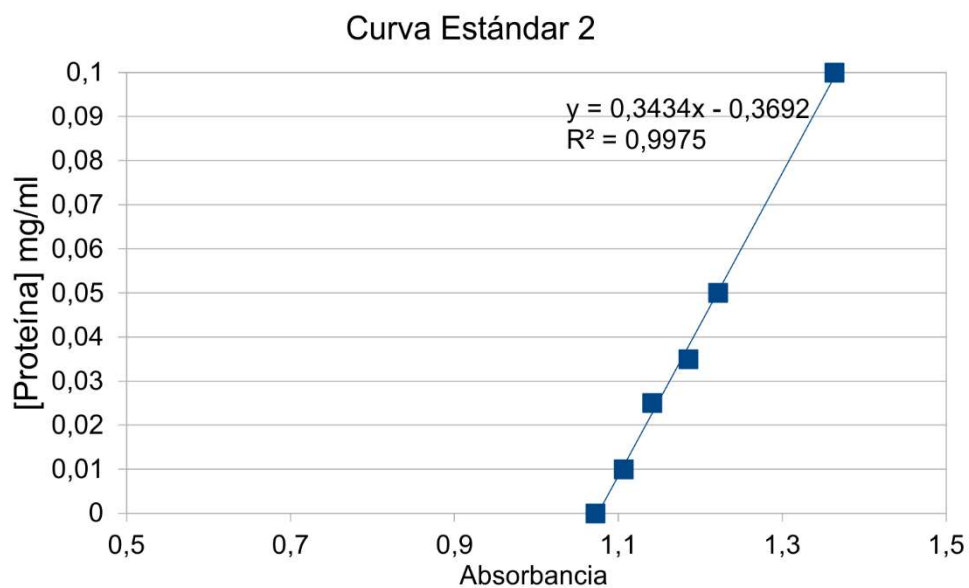
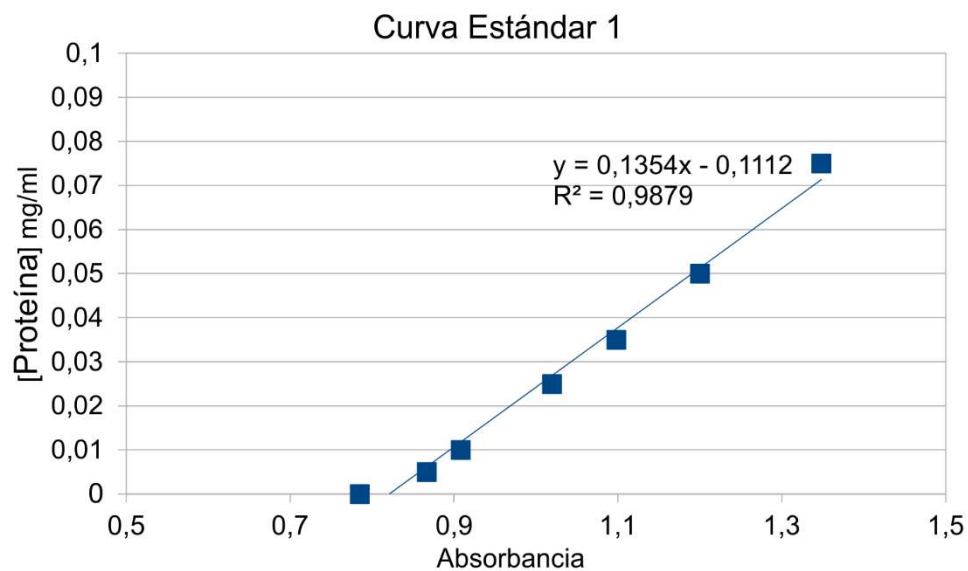
Para la solución 5 tomar alícuotas de 1 mL de cada una de las soluciones y completar con  $\text{H}_2\text{O}_d$  hasta un volumen final de 1 L.

Solución 6: Sulfato de Hierro ( $\text{FeSO}_4$ )

e Hidróxido de Sodio ( $\text{NaOH}$ ).....10 mg y 3,98 mg/ L  $\text{H}_2\text{O}_d$ .

Se prepararon estas 6 soluciones madre, las cuales se conservaron a temperatura ambiente. Cada vez que se necesitó preparar el medio, se tomaron 2,5 mL de cada una y se completó la solución a volumen final 1 L con  $\text{H}_2\text{O}_d$ .

## Apartado 2: Curvas estándares de Albúmina Bovina para la determinación de la concentración de proteínas.





### **Apartado 3: Reactivo de Bradford para la determinación de la concentración de proteínas.**

- Disolver 100 mg del colorante Coomassie Blue G250 en 50 ml etanol 95% y 100 ml ácido ortofosfórico 85%,
- Agregar lentamente H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> refrigerando el recipiente hasta completar 1 L.

### **Apartado 4: solución amortiguadora fosfato salina (PBS 1X).**

Reactivo	Masa (g)	Concentración Final
NaCl	8	137 mM
KCl	0,2	2,7 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,44	10 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,24	1,8 mM

- Disolver las sales en 800 mL H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>.
- Ajustar pH a 7,4 con HCl.
- Completar con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> hasta 1 L de solución final.

### **Apartado 5: Soluciones de lisis para ensayo cometa en peces.**

Reactivo	Masa (g)/ volumen (mL)*	Concentración final
NaCl	146,1 g	2,5 M
EDTA	29,22 g	0,1 M
Tris	1,21 g	0,01 M
DMSO	100 mL	10 % v/v
Tritón-X 100	1 mL	0,1 % v/v

\*Cantidades para 1 L de solución. Llevar a pH 10.



FACULTAD *de* CIENCIAS  
EXACTAS *y* NATURALES  
UNIVERSIDAD NACIONAL  
*de* MAR DEL PLATA

